

Elicitoren der Duftstoffemission von Rainfarnpflanzen

Dissertation

zur Erlangung des Dr. rer. nat. der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl.-Biochem.

Lienhard Mack

aus Hamburg

Bayreuth, im Januar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2007 bis Januar 2012 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Karlheinz Seifert am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	16. 1. 2012
Zulassung durch die Prüfungskommission:	18. 1. 2012
Wissenschaftliches Kolloquium:	16. 4. 2012

Amtierender Dekan:
Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:
Prof. Dr. Karlheinz Seifert (Erstgutachter)
PD Dr. Stefan Dötterl (Zweitgutachter)
Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitz)
PD Dr. Gregor Aas

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bzw.	beziehungsweise
CDP	Cytidyldiphosphat
CLSA	Closed-Loop-Stripping-Analysis
ESI	Elektrospray-Ionisation
eV	Elektronenvolt
FG	Frischgewicht
FPP	Farnesylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IPP	Isopentenylpyrophosphat
Me	Methyl-
mech.	mechanisch
MEP	Methylerythritolphosphat
MVA	Mevalonat
NADP ⁺	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
l	Liter
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie / Massenspektrum
P _i	Phosphat
PP _i	Pyrophosphat
Raumtemp.	Raumtemperatur
SPE	Solid Phase Extraction

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen.....	7
1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	14
2. Allgemeines.....	16
2.1 Der Herbivore <i>Spodoptera littoralis</i>	16
2.2 Der Rainfarn <i>Tanacetum vulgare</i> L.	17
2.3 Terpene aus Pflanzen	17
2.3.1 Biosynthese von Terpenen	18
2.3.1.1 Der Mevalonatweg	19
2.3.1.2 Der Methylerythritolphosphat-Weg	21
2.3.1.3 Bildung der Terpenvorstufen Geranyl- und Farnesylpyrophosphat....	24
2.3.1.4 Bildung von Monoterpenen aus Geranylpyrophosphat	25
2.3.1.5 Bildung von Sesquiterpenen aus Farnesylpyrophosphat	27
2.3.2 Biologische Aktivität von Terpenen.....	29
3. Ergebnisse und Diskussion	35
3.1 Analyse des Regurgitats von <i>Spodoptera littoralis</i> - Larven.....	35
3.1.1 HPLC-Trennungsgang.....	38
3.1.2 Charakterisierung der HPLC-Fractionen	40
3.1.2.1 NMR-Spektroskopie von Fraktion F0/6	40
3.1.2.2 HPLC und HPLC-ESI-MS von Fraktion F0/6.....	42
3.2 Untersuchung des Duftstoffspektrums von Rainfarn	49
3.2.1 Monoterpene	49
3.2.1.1 Monoterpen-Elicitoraktivitäten von Fraktion F0 und ihren HPLC- Unterfraktionen	50
3.2.1.2 Monoterpen-Elicitoraktivitäten von Oligosacchariden	56
3.2.2 Sesquiterpene	62

3.2.2.1 Sesquiterpen-Elicitoraktivitäten von Fraktion F0 und ihren HPLC-Unterfraktionen	62
3.2.2.2 Sesquiterpen-Elicitoraktivitäten von Oligosacchariden	65
3.3 Diskussion.....	67
4. Zusammenfassung.....	75
4.1 Deutsche Zusammenfassung.....	75
4.2 Summary in English.....	78
5. Experimenteller Teil.....	81
5.1 Chemikalien	81
5.2 Pflanzen	81
5.3 Herbivore	81
5.3.1 Haltung der Herbivoren	81
5.3.2 Sammlung des Regurgitats	82
5.3.3 Aufarbeitung des Regurgitats	82
5.3.4 Festphasenextraktion	83
5.4 Closed-Loop-Stripping-Analysis	83
5.4.1 Aufbau der Anlage.....	83
5.4.2 Reinigung der CLSA-Anlage	84
5.4.3 Durchführung der CLSA-Messung.....	85
5.4.4 Extraktion des Aktivkohlefilters.....	86
5.4.5 Reinigung und Aktivierung des Aktivkohlefilters	88
5.5 Gaschromatographie.....	88
5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	89
5.6.1 Analytische HPLC.....	89
5.6.2 HPLC-MS	89
5.6.3 Herstellung eines Oligosaccharid-Standards für die HPLC	90
5.6.4 HPLC-Messung der präparativ gewonnenen Fraktion F0/6.....	90
5.6.5 HPLC-Messung einer Coinjektion von Fraktion F0/6 und Verbasco 91	

5.7 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS-ESI-FT-ICR)	91
5.8 NMR-Spektroskopie	91
5.8.1 Herstellung einer NMR-Probe von Fraktion F0 (gesamt).....	91
5.8.2 Herstellung einer NMR-Probe von Fraktion F0/6.....	91
5.8.3 Gerätedaten.....	92
6. Duftstoffe des Rainfarns	93
6.1 Monoterpene	93
6.2 Sesquiterpene	100
7. Literaturverzeichnis	102
8. Danksagung	106
9. Erklärung	107

1. Einleitung

1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Pflanzen benötigen ein wirksames Abwehrsystem gegen Pilze, Bakterien, Viren und Fraßfeinde, da sie standortgebunden sind und sich deshalb nicht durch Flucht schützen können. Sie setzen dabei mechanische und chemische Verteidigungsstrategien, oft in Kombination, ein. Der mechanischen Verteidigung dienen z. B. Dornen oder Trichome (Pflanzenhaare).

Zur chemischen Verteidigung benutzen Pflanzen unterschiedliche Strategien. Die konstitutive chemische Verteidigung beruht darauf, dass Sekundärmetaboliten, die der Verteidigung dienen, also Toxine gegen Herbivoren sind oder abschreckend oder fraßhemmend auf sie wirken, ständig produziert und in der Zelle gespeichert werden. Beispiele sind Coumarine, Flavonoide, Terpene und Alkaloide.

Die konstitutive chemische Verteidigung hat auch gewisse Nachteile. Zum einen können z. B. Fraßfeinde Resistenzen gegen bestimmte pflanzliche Toxine ausbilden. Ein Beispiel hierfür sind Raupen des amerikanischen Tabakschwärmers *Manduca sexta*, die das toxische Nicotin der Tabakpflanze *Nicotiana sylvestris* schnell wieder ausscheiden können [1, 2]. Zum anderen bedeutet die dauerhafte Synthese der Verteidigungsmetaboliten für die Pflanze einen hohen Energie- und Ressourcenaufwand.

Viele Pflanzen verwenden auch induzierte chemische Verteidigungsmechanismen, die erst bei Befall der Pflanze ausgelöst werden. Sie bilden zum Beispiel Proteaseinhibitoren, die eine hohe Aktivität gegenüber bakteriellen oder tierischen Proteasen aufweisen, oder Duftstoffe. Um spezifisch auf Herbivorebefall reagieren zu können, benötigen die Pflanzen ein effektives Signalsystem, das sie zwischen umweltbedingten rein mechanischen Verletzungen und Herbivorebefall unterscheiden lässt.

Substanzen, die als Botenstoffe in Pflanzen Abwehrreaktionen gegen Fraßfeinde und Krankheitserreger auslösen, werden Elicitoren genannt. Bei Fraß einer Raupe an der Pflanze gelangen die Elicitoren mit deren Vorderdarmsekret in die Fraßwunde und lösen in der Pflanze enzymatische Reaktionen aus. Das Vorderdarmsekret bezeichnet man als Regurgitat.

Zu den pflanzlichen Abwehrreaktionen bei Herbivorebefall gehört die Produktion von Duftstoffen, die fraßhemmend, toxisch oder abschreckend auf die Herbivoren wirken [3, 4] oder die Entomophagen, also die Fraßfeinde der Herbivoren, anlocken.

Bisher sind ca. 250 unterschiedliche Elicitoren bekannt, die Pflanzen Pathogenbefall signalisieren. Die meisten von ihnen wurden in Pilzen nachgewiesen. Die bisher in Herbivoren gefundenen Elicitoren gehören zu sechs verschiedenen Verbindungsklassen [5, 6, 7].

Im Regurgitat von Larven des großen Kohlweißlings *Pieris brassicae* wurde eine β -Glucosidase nachgewiesen, die eine duftstoffinduzierende Wirkung bei Gemüsekohl *Brassica oleracea* hat. Die Elicitorwirkung der β -Glucosidase konnte anhand käuflicher β -Glucosidase aus Mandeln nachvollzogen werden. Die induzierten Duftstoffe, unter anderem 3-Pentanon, (*Z*)-3-Hexenylacetat und viele weitere flüchtige niedere Aldehyde, Alkohole und Monoterpene haben eine stark anlockende Wirkung auf die parasitische Kohlweißlings-Schlupfwespe *Cotesia glomerata* [6].

Die Eiablageflüssigkeit von *Pieris brassicae* enthält Benzylcyanid [7]. Dieses induziert bei Gemüsekohl eine bisher nicht bekannte Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Blattoberfläche. Dadurch wird die Verweildauer der parasitischen Schlupfwespe *Trichogramma brassicae* auf dem Blatt erhöht, die die Eier von *Pieris brassicae* parasitiert [7, 8].

Eine Reihe von Elicitoren herbivorer Insekten sind N-Acylglutaminkonjugate oder N-Acylglutamatkonjugate. Als erster Vertreter dieser Verbindungsklasse wurde 1997 von H. T. Alborn *et al.* Volicitin (N-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-glutamin, **1**) aus dem Regurgitat von *Spodoptera exigua* - Raupen isoliert und als Auslöser von Abwehrreaktionen bei *Zea mays* identifiziert [9] (Abbildung 1). Es induziert dort die

Freisetzung flüchtiger Terpenoide, u. a. von (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien und (*E*)- β -Farnesen, sowie von Indol. Dadurch werden Weibchen der parasitischen Wespe *Cotesia marginiventris* angelockt, einem natürlichen Feind von *Spodoptera exigua* [10].

Aus dem Regurgitat der Raupen des Tabakswärmers *Manduca sexta* und der Raupen von *Manduca quinquemaculata* wurden die strukturell verwandten Fettsäurekonjugate N-Linolenoyl-L-glutamin (**2**), N-Linolenoyl-L-glutamat (**3**) und N-Linoleoyl-L-glutamat (**6**) isoliert. Sie induzieren dort die Freisetzung von *cis*- α -Bergamoten, das Parasiten der Raupen anlockt.

Auch die Fettsäurekonjugate **4**, **5**, **7** und **8** wurden inzwischen in weiteren Lepidopteren gefunden und als Elicitoren erkannt [11, 12, 13, 14].

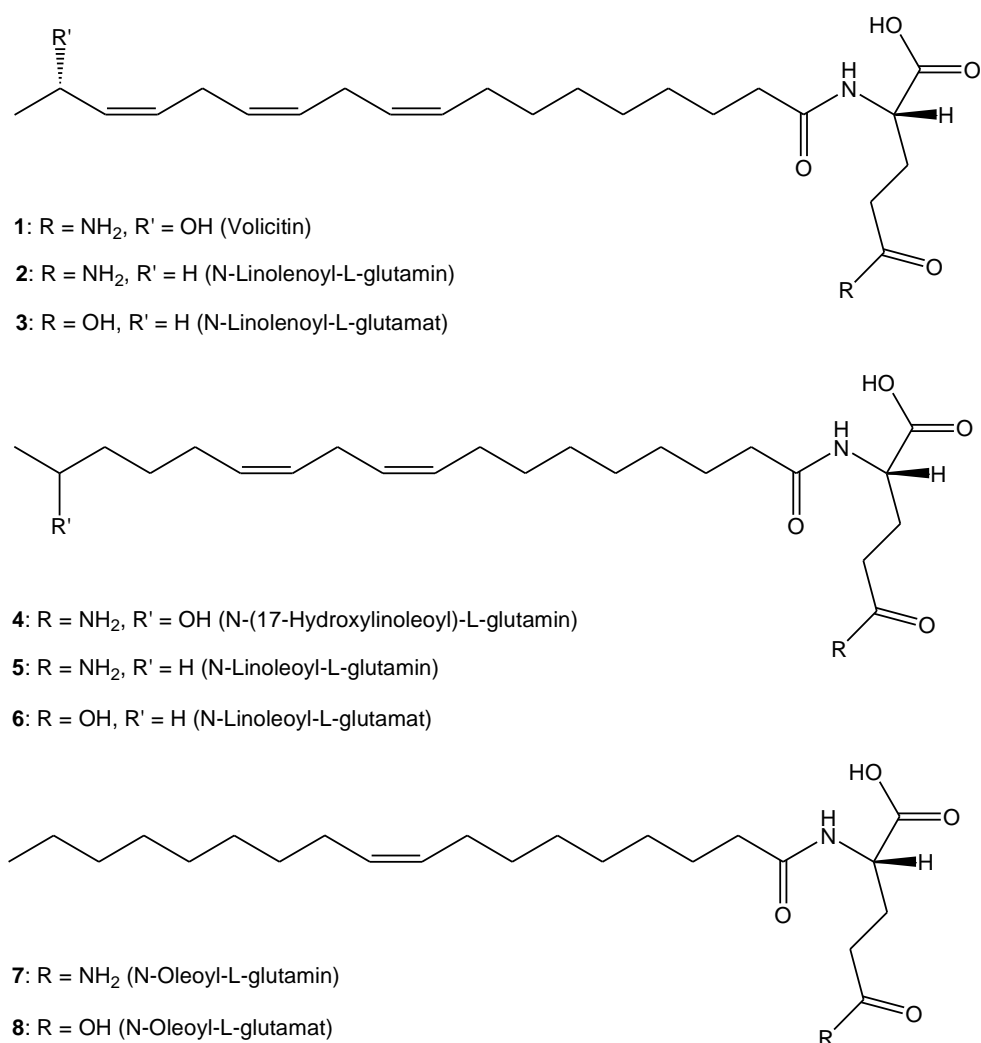


Abbildung 1: Struktur von Volicitin (1) und den Fettsäurekonjugaten 2 – 8

C. L. Truitt, H.-X. Wie und P. W. Paré zeigten mit L-[3,4-³H(N)]-Gln radioaktiv markiertem Volicitin, dass es in den zellulären Plasmamembranen von *Zea mays* einen spezifischen Rezeptor für Volicitin gibt [15]. Nicht markiertes Volicitin wirkte kompetitiv. Die Bindungsaffinität des Elicitors korrelierte mit der Elicitierungsaktivität. Volicitin wirkt also über einen rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweg. Es bindet nicht an Lipiddoppelschichten ohne Membranproteine. Ein Wirkmechanismus, der auf einer Veränderung des Membranpotentials durch Störung der Membranstruktur infolge einer Detergergenzwirkung des Volicitins beruht, konnte daher ausgeschlossen werden [15].

Volicitin (1) wurde auch im Regurgitat von *Spodoptera littoralis* - Raupen nachgewiesen [16]. Jedoch induziert es keine Duftstoffemission bei Pflanzen von Baumwolle *Gossypium hirsutum* und Limabohne *Phaseolus lunatus* [16]. Dagegen wurde bei Fraß von *Spodoptera littoralis* - Raupen an Limabohnenpflanzen ein charakteristisches Duftstoffspektrum festgestellt. Es muss also im Regurgitat von *Spodoptera littoralis* - Raupen andere Elicitoren geben, die die pflanzenspezifische Abwehrreaktion der Limabohne auslösen [17].

Elicitoren der pflanzlichen Duftstoffsynthese kommen nicht nur in Lepidopteren, sondern auch in anderen herbivoren Insekten vor. So wurden im Regurgitat der amerikanischen Heuschrecke *Schistocerca americana* sulfoxxygenierte Fettsäuren und ihre Glycinkonjugate gefunden, die Caeliferine **9** – **12** (Abbildung 2). Diese induzieren in *Zea mays* die Duftstoffe (*E*)- β -Caryophyllen, (*E*)- α -Bergamoten, α -Humulen und (*E*)- β -Farnesen, die fraßhemmend wirken [18].

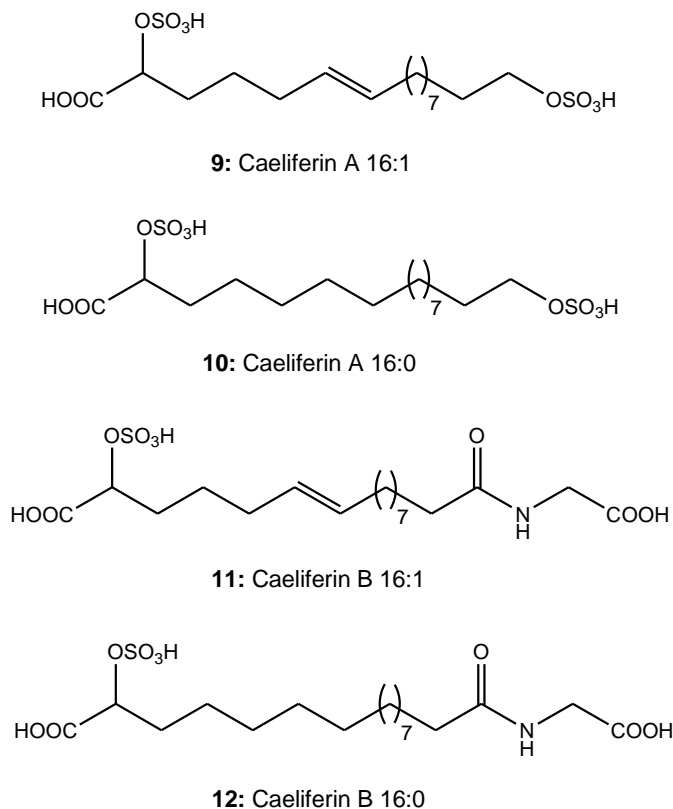


Abbildung 2: Struktur der Caeliferine 9 – 12

Spodoptera frugiperda sekretiert mit seinem Regurgitat ein disulfidverbrücktes Undecapeptid, das Inceptin **13**, das bei der Augenbohne *Vigna unguiculata* Abwehrreaktionen auslöst (Abbildung 3). Es induziert einen erhöhten Spiegel der Phytohormone Ethylen, Salicylsäure und Jasmonsäure und die Freisetzung der Duftstoffe (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien, (*E*)- β -Farnesen, (*E,E*)- α -Farnesen, Methylsalicylat, (*E*)- β -Ocimen, Indol und (3*E*,7*E*)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen. Es wurde gezeigt, daß diese Abwehrreaktion den Fraß von *Spodoptera frugiperda* - Larven hemmt [19].

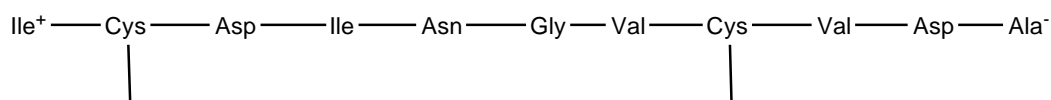
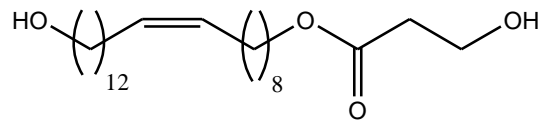
**13: Inceptin**

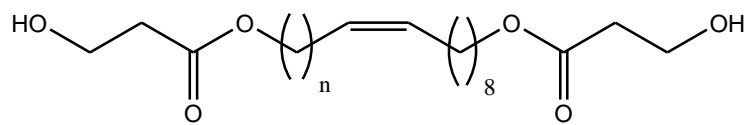
Abbildung 3: Aminosäuresequenz von Inceptin (13)

Die Blattkäfer *Bruchus pisorum* L. (Gemeiner Erbsenkäfer) und *Callosobruchus maculatus* F. sondern bei der Eiablage die Bruchine A – D **14 – 17** ab (Abbildung 4).

Diese werden von der Erbse *Pisum sativum* erkannt und induzieren im intakten Blatt ein Wachstum von tumorähnlichem Callusgewebe unter den Eiern. Dadurch wird verhindert, dass sich frisch geschlüpfte Larven direkt in das Blattgewebe bohren können [20].

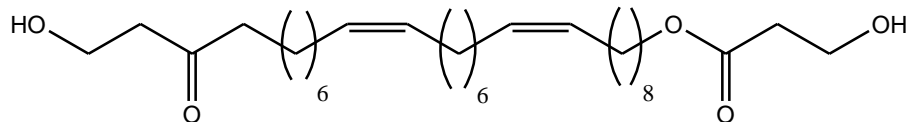


14: Bruchin A



15: Bruchin B (n = 12)

16: Bruchin C (n = 14)



17: Bruchin D

Abbildung 4: Struktur der Bruchine 14 – 17

Aus Pilzen sind Oligosaccharide als Elicitoren der pflanzlichen Abwehr bekannt. Aus der Zellwand des Pilzes *Phytophthora sojae*, eines Pathogens, das bei der Sojabohne *Glycine max* die Stamm- und Wurzelfäule auslöst, wurde ein Hepta- β -D-glucosid (**18**) (Abbildung 5) isoliert [21]. Es induziert in *Glycine max* die Synthese von Phytoalexinen, z. B. Glyceollin I (**19**) (Abbildung 6), eines Isoflavonoids, das fungizid wirkt [21].

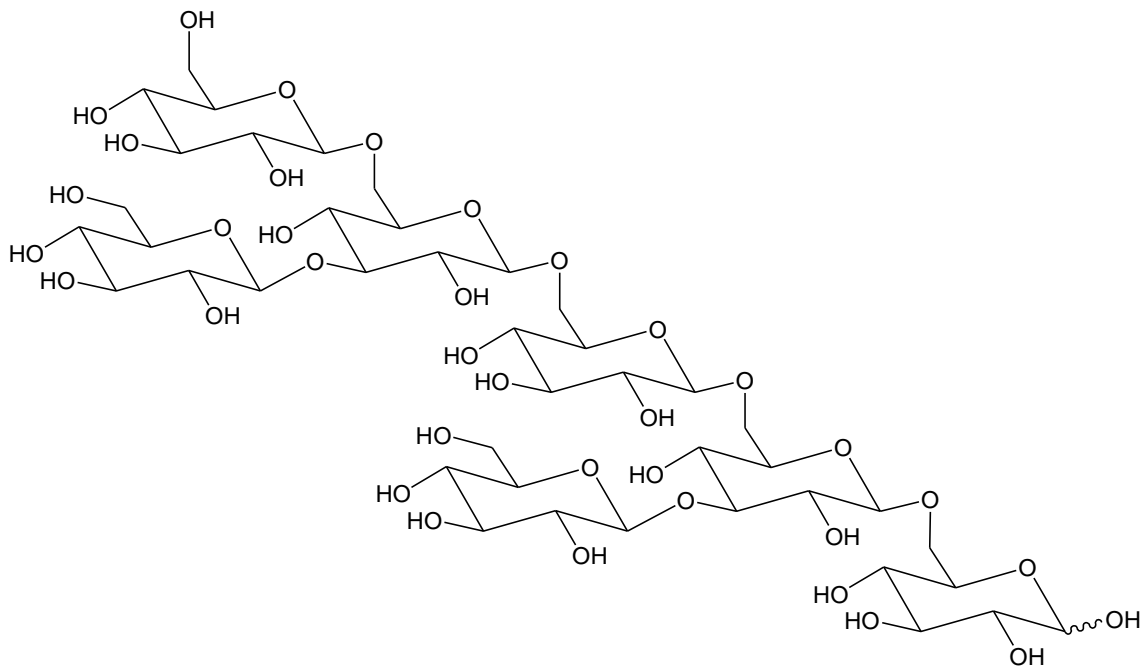


Abbildung 5: Struktur eines Hepta- β -D-glucosids (18) aus *Phytophthora sojae* mit Elicitoraktivität in *Glycine max*

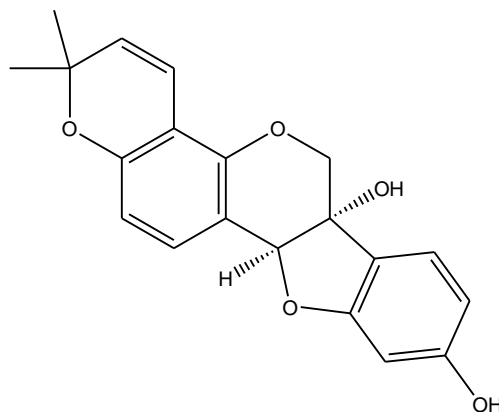


Abbildung 6: Struktur des Phytoalexins Glyceollin I (19)

Von M. G. Hahn *et al.* wurde gezeigt, dass es in den Zellmembranen von Kotyledonen (Keimblättern) der Sojabohnenpflanze *Glycine max* ein Elicitor-Bindungs-Protein gibt, an das das Hepta- β -D-glucosid (18) spezifisch mit hoher Affinität bindet [22] (Abbildung 7). Strukturell ähnliche synthetische Oligosaccharide mit hoher Elicitierungsaktivität, z.B. ein Hexa- β -D-glucosid, sind kompetitive Inhibitoren der Bindung des radioaktiv markierten Hepta- β -D-glucosids an die Zellmembran. Die Bindungsaffinität des Elicitors korrelierte dabei mit der Elicitierungsaktivität für Phytoalexine. Damit konnte nachgewiesen werden, dass dieser Elicitor eine parakrine rezeptorvermittelte Signaltransduktion einleitet. Über die

weitere Signaltransduktion zur Prenyltransferase und Glyceollin-Synthase ist bislang nichts bekannt.

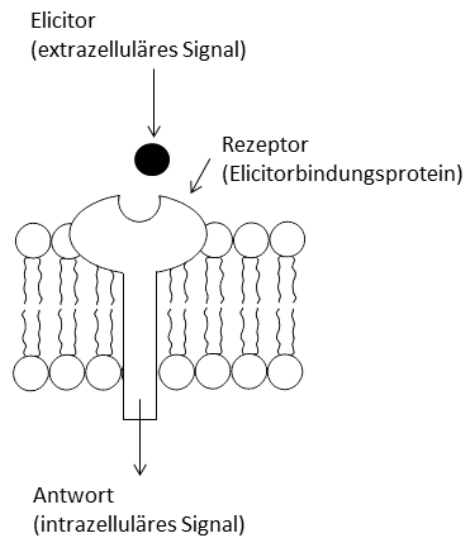


Abbildung 7: Mechanismus der parakrinen rezeptorvermittelten Signaltransduktion

Das Hepta- β -D-glucosid (**18**) aus *Phytophthora sojae* wurde an Pflanzen des Gestutzten Schneckenklee *Medicago truncatula* appliziert und induzierte eine Duftstoffemission von hauptsächlich Sesquiterpenen [23], die vergleichbar war mit der bei Fraß von *Spodoptera littoralis* Raupen an Pflanzen von *Medicago truncatula*.

1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Aus Arbeiten von P. Gros in unserem Arbeitskreis, die von J. Burkhardt dokumentiert wurden [24, 25], ist bekannt, dass im Regurgitat von *Spodoptera littoralis* - Raupen mehrere Elicitoren der Duftstoffemission bei Rainfarnpflanzen vorhanden sein müssen, die keine Proteine sind.

Diese sollen durch HPLC isoliert und durch HPLC-ESI-MS identifiziert werden. Wenn die isolierten Substanzmengen ausreichen, sollen durch NMR-Spektroskopie die Strukturen der Elicitoren bestimmt werden.

Der Nachweis der Elicitoraktivität soll durch Applikation der HPLC-Fractionen in wässriger Lösung an mechanisch verletzte Rainfarnpflanzen erfolgen, wonach die emittierten Duftstoffe mithilfe der CLSA-Technik gesammelt werden und durch GC-

Analyse qualitativ und quantitativ bestimmt werden können. Durch Vergleich der Duftstoffemissionen mit denen von mechanisch verletzten Pflanzen in Wasser als Referenz wird dann die Induktion der Duftstoffbiosynthese nachgewiesen. Bei bekannter Struktur der isolierten Elicitoren soll mit Referenzsubstanzen deren Aktivität validiert werden.

2. Allgemeines

2.1 Der Herbivore *Spodoptera littoralis*

Spodoptera littoralis, die ägyptische Baumwolleule, gehört der Gattung der Schmetterlinge *Lepidoptera*, der Familie der Eulenfalter *Noctuidae*, sowie der Unterfamilie der *Amphipyrinae* an. Entdeckt und charakterisiert wurde diese Art 1833 von J. B. Boisduval.

Ihre Raupen erreichen eine Größe von 45 mm, sind bräunlich gefärbt und tragen drei orangebraune Streifen entlang des Rückens (Abbildung 8a) [26]. Die adulten Schmetterlinge haben eine Flügelspannweite von ca. 4 cm, eine Länge von ca. 2 cm und eine charakteristische, an Eulen erinnernde Zeichnung der Vorderflügel, die der Familie der Eulenfalter den deutschen Namen gab (Abbildung 8b). Sie sind überwiegend nacht- oder dämmerungsaktiv.



Abbildung 8: a Raupe (links, Foto: P. Gros), b adulter Schmetterling (rechts, [25]) von *Spodoptera littoralis*

Die ägyptische Baumwolleule kommt in den mediterranen Ländern und Afrika vor, wandert jedoch in den Sommermonaten auch nach Mittel- und Nordeuropa ein [26]. *Spodoptera littoralis* ist ein Generalist, das heißt, das Futterspektrum ihrer Raupen umfasst nahezu alle krautigen Pflanzen, sowie eine Vielzahl von Sträuchern und Laubbäumen. Beispielsweise werden durch sie die Baumwollplantagen der Mittelmeerländer sowie Nutzpflanzen in hiesigen Gewächshäusern in erheblichem Umfang geschädigt [27]. Untersuchungen, die der Bekämpfung von *Spodoptera littoralis* dienen, haben daher eine wirtschaftliche Bedeutung im Pflanzenschutz.

2.2 Der Rainfarn *Tanacetum vulgare* L.

Der Rainfarn *Tanacetum vulgare* (Synonym: *Chrysanthemum vulgare*) gehört zur Ordnung der Asternartigen *Asterales* und der Familie der Korbblütler *Asteraceae* (Unterfamilie *Asteroideae*, Tribus *Anthemideae*). Er ist eine stark wuchernde, mehrjährige krautige Pflanze mit 30-150 cm langem stammartigem Stiel und dunkelgrünen länglich gefiederten Blättern, die stark duften. Seine Blütezeit ist in den Monaten Juni-September. Er trägt gelbe, knopfförmige Körbchenblütenstände, die in Doldenrispen gruppiert sind (Abbildung 9a, Abbildung 9b) [28]. Alle seine Blüten sind zwittrig.



Abbildung 9: a Rainfarnpflanze blühend (links), b Rainfarnblatt (rechts, [25])

Der Rainfarn ist ein interessantes Testobjekt für die Elicitierung von Duftstoffen, da er besonders viele ätherische Öle enthält und dementsprechend eine hohe und diverse Duftstoffemission hat.

2.3 Terpene aus Pflanzen

Terpene sind eine sehr große und heterogene Gruppe von Naturstoffen, deren Kohlenwasserstoffgerüst aus dem Grundbaustein Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) zusammengesetzt ist. Ihre Biosynthese beginnt bei aktiviertem Isopren, dem Isopentenylpyrophosphat (IPP, **20**).

Sie wurden durch F. A. Kekulé nach dem Baumharz Terpentin benannt, das neben Harzsäuren eine Vielzahl von Kohlenwasserstoffen enthält [29]. Bislang sind etwa 35000 Terpene bekannt. Sie sind Hauptbestandteil der in Pflanzen produzierten ätherischen Öle und sind Sekundärmetaboliten, das heißt, ihre Biosynthese erfolgt weder im Energiestoffwechsel, noch im anabolen oder katabolen Stoffwechsel.

Mit einer unterschiedlichen Anzahl an Isopreneinheiten, über verschiedene Cyclisierungswege und durch Derivatisierungen sind viele unterschiedliche Terpene zugänglich. Nach der Anzahl der Isopreneinheiten, aus denen ihr Kohlenwasserstoffgerüst zusammengesetzt ist, unterteilt man sie in Hemiterpene (C_5 , 1 Isopreneinheit), Monoterpene (C_{10} , 2 Isopreneinheiten), Sesquiterpene (C_{15} , 3 Isopreneinheiten), Diterpene (C_{20} , 4 Isopreneinheiten), Sesterterpene (C_{25} , 5 Isopreneinheiten), Triterpene (C_{30} , 6 Isopreneinheiten) und schließlich Tetraterpene (C_{40} , 8 Isopreneinheiten) [30].

Durch die Effizienz der biosynthetischen Zugänglichkeit einer großen Diversität von Terpenen aus IPP (**20**) ist der Einsatz von Terpenen zur chemischen Verteidigung für Pflanzen eine gute Strategie. Mit minimiertem Ressourcenaufwand wird ein breites Wirkungsspektrum erreicht.

2.3.1 Biosynthese von Terpenen

Die Biosynthese des Grundbausteins aller Terpene, IPP (**20**), kann auf zwei Wegen erfolgen, dem Mevalonat-Weg (MVA-Weg) und den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg). Die Synthese nach dem MVA-Weg erfolgt im Cytosol, während die Synthese nach dem MEP-Weg in den Plastiden abläuft [31]. D. Umlauf *et al.* zeigten durch ^{13}C -Isotopenmarkierung, dass IPP (**20**) und 3,3-Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **21**), die im chemischen Gleichgewicht stehen, von Rainfarn sowohl über den MVA-Weg, als auch über den MEP-Weg synthetisiert werden [32]. Bei beiden Biosyntheserouten verlaufen sämtliche Reaktionen enzymkatalysiert.

2.3.1.1 Der Mevalonat-Weg

Der Mevalonatweg [33] wurde von K. E. Bloch, F. Lynen und J. W. Cornforth entdeckt [34]. Die Biosynthese des IPP erfolgt hier aus drei Molekülen der „aktivierten Essigsäure“ Acetyl-SCoA (**22**) (Abbildung 10). Sie beginnt mit einer biologischen Claisen-Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-SCoA (**22**) zu Acetoacetyl-SCoA (**23**), die durch Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT, EC 2.3.1.9) [35] katalysiert wird. Das Acetoacetyl-SCoA reagiert nach dem Mechanismus einer Aldolkondensation mit einem weiteren Äquivalent Acetyl-SCoA zu (S)-3-Hydroxymethylglutaryl-SCoA (**24**). Diese Reaktion wird von der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase (HMG-CoA-Synthase, HMGS, EC 2.3.3.10) katalysiert.

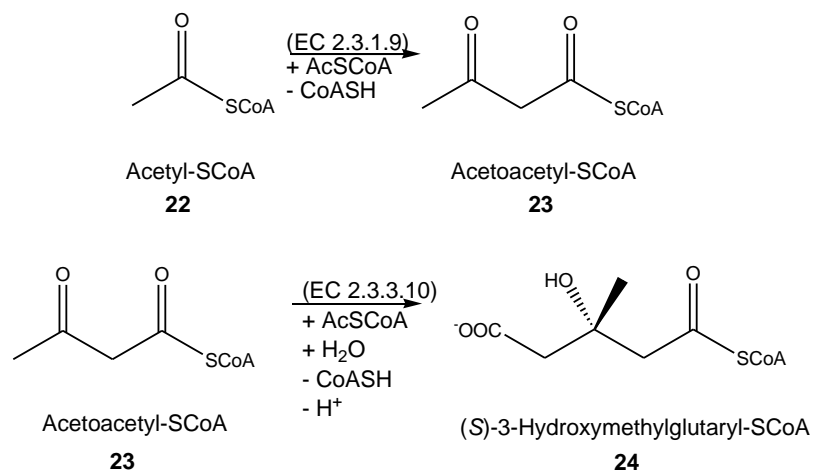


Abbildung 10: Kondensation von Acetyl-SCoA (**22**) zu (S)-3-Hydroxymethylglutaryl-SCoA (**24**)

Anschließend wird katalysiert durch die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase, HMGCR, EC 1.1.1.34) bei der Reduktion von (S)-3-Hydroxymethylglutaryl-SCoA (**24**) mit NADH ein CoASH abgespalten und es bildet sich (R)-Mevalonat (**25**), das diesem Syntheseweg seinen Namen gibt (Abbildung 11). Für diese Reduktion gibt es noch ein weiteres, NADPH-abhängiges Enzym (EC 1.1.1.88), welches anstelle von NADH/H⁺ das NADPH/H⁺ als Cofaktor umsetzt. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend für den Mevalonatweg.

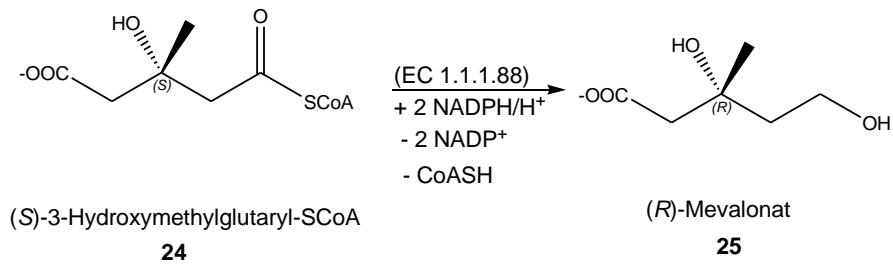


Abbildung 11: Reduktive Spaltung von (S)-3-Hydroxymethylglutaryl-SCoA (24) zu (R)-Mevalonat (25)

Die terminale OH-Gruppe des (R)-Mevalonats (25) wird anschließend von Mevalonatkinase (EC 2.7.1.36) durch ATP phosphoryliert; es bildet sich 5-Phospho-(R)-mevalonat (26) (Abbildung 12). Dieses wird durch Phosphomevalonat-Kinase (EC 2.7.4.2) mit einem weiteren Äquivalent ATP nochmals phosphoryliert, wobei 5-Pyrophospho-(R)-mevalonat (27) entsteht.

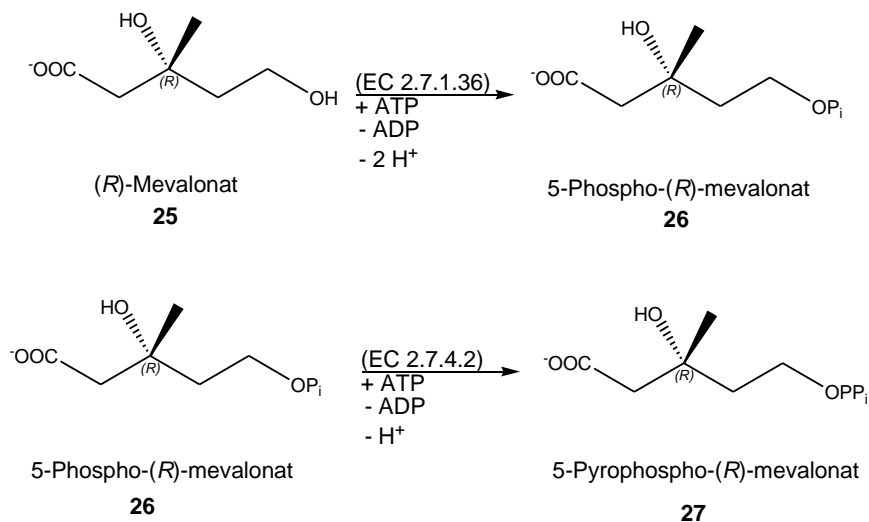


Abbildung 12: Phosphorylierung von (R)-Mevalonat (25)

Letzteres wird von der Diphosphomevalonat-Decarboxylase (MDDase, EC 4.1.1.33) an der 3-Hydroxyfunktion nochmals durch ATP phosphoryliert. Die entstandene Zwischenstufe (28) wird vom selben Enzym decarboxyliert und es wird Phosphat eliminiert, wobei sich das aktive Isopentenylpyrophosphat (IPP, 20) bildet (Abbildung 13).

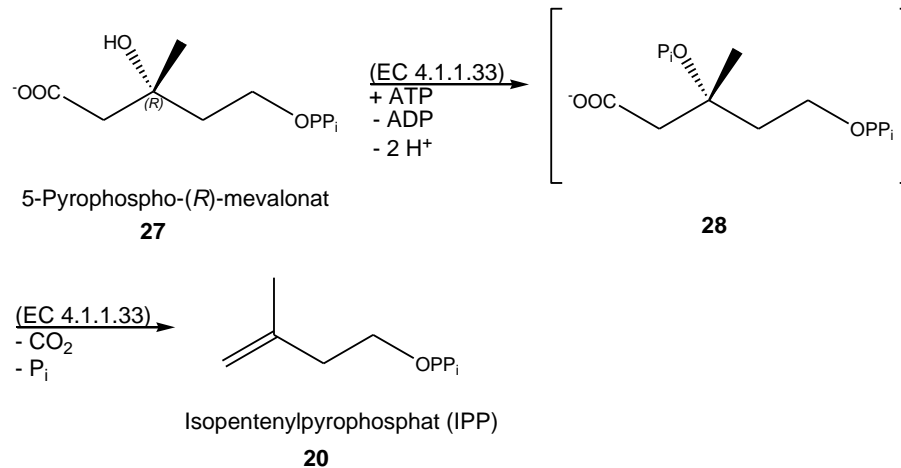


Abbildung 13: Bildung des Isopentenylpyrophosphats (20)

Die IPP-Isomerase (EC 5.3.3.2) wandelt **20** in einer Gleichgewichtsreaktion in das thermodynamisch stabilere 3,3-Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **21**) um. Das chemische Gleichgewicht ist mit einem Verhältnis von IPP zu DMAPP von 13:87 deutlich auf die Seite von DMAPP verschoben [36] (Abbildung 14).

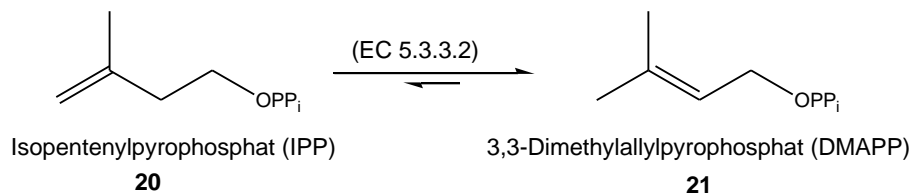


Abbildung 14: Gleichgewicht zwischen IPP (20) und DMAPP (21)

2.3.1.2 Der Methylerythritolphosphat-Weg

Neben dem MVA-Weg gibt es einen weiteren Biosyntheseweg für IPP und DMAPP, den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg) [37]. Er wurde 1993 von M. Rohmer [38] und D. Arigoni [39, 40] unabhängig voneinander entdeckt. Der MEP-Weg beginnt mit einer Verknüpfung von Pyruvat (**29**) mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**30**), die unter Decarboxylierung zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP, **31**) führt und durch die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (EC 2.2.1.7) katalysiert wird (Abbildung 15).

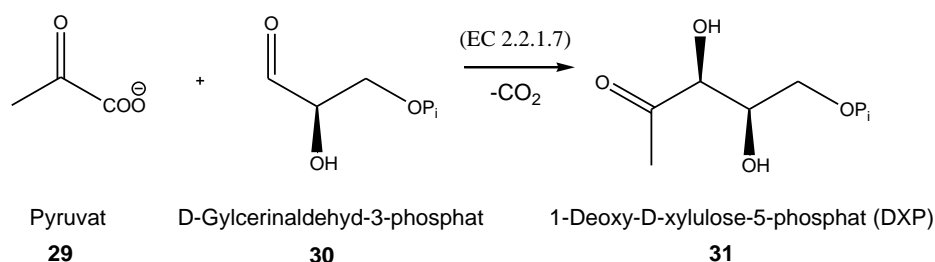


Abbildung 15: Biosynthese von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (31)

Das Keton DXP (**31**) wird durch die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXP-Reduktoisomerase, EC 1.1.1.267) umgelagert und mit NADPH/H⁺ als Cofaktor zum Triol 2C-Methylerythritol-4-phosphat (MEP, **32**) reduziert. Dieses gibt dem MEP-Weg seinen Namen. Das MEP wird anschließend durch Addition von Cytidyltriphosphat (CTP) von der 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-cytidylyltransferase (EC 2.7.7.60) zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME, **33**) umgesetzt (Abbildung 16).

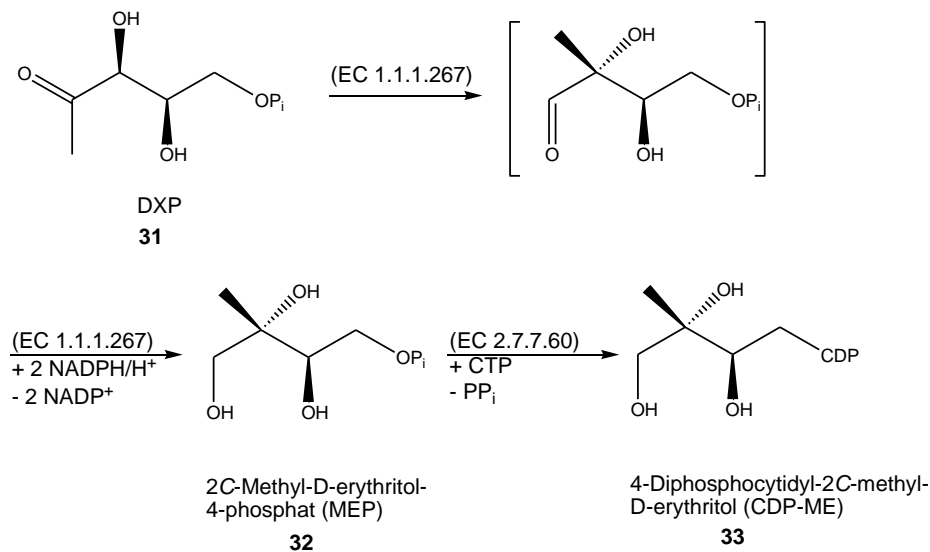


Abbildung 16: Biosynthese von 2-C-Methylerythritol-4-phosphat (MEP, 32) und 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME, 33) im MEP-Weg

Die Phosphorylierung der tertiären Alkoholfunktion von CDP-ME (**33**) durch 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase (EC 2.7.1.148) mit ATP als Cofaktor führt zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP, **34**). Nach Abspaltung des Cytidylrests und Ringschluss entsteht 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP, **35**). Das hierfür verantwortliche Enzym ist die 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (EC 4.6.1.12) (Abbildung 17).

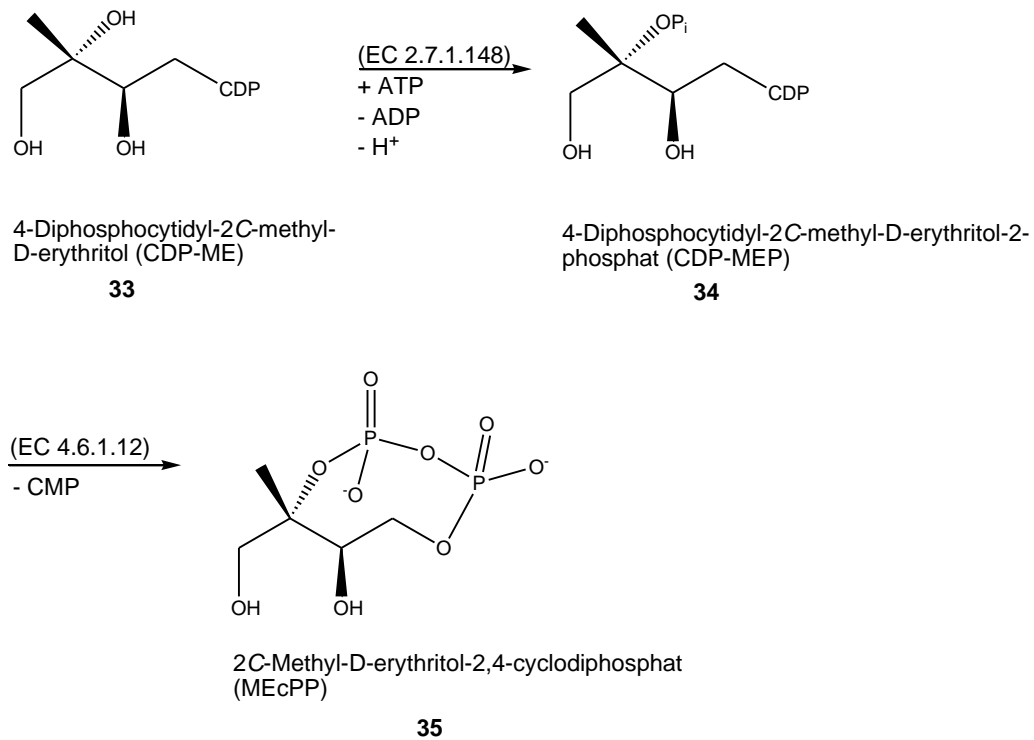


Abbildung 17: Biosynthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (35) im MEP-Weg

Der cyclische Phosphorsäurediester **35** wird geöffnet und die 3-Hydroxyfunktion abgespalten, wobei (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat (HMBPP, **36**) entsteht. Das hierfür verantwortliche Enzym ist die (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Synthase (EC 1.17.7.1). Dabei werden 2 reduzierte Ferredoxine als Reduktionsmittel umgesetzt. Das HMBPP wird von HMBPP-Reduktase (EC 1.17.1.2) anschließend zu DMAPP (**21**) und IPP (**20**) reduziert. Dabei wird NADPH/H⁺ oxidiert und Wasser abgespalten (Abbildung 18).

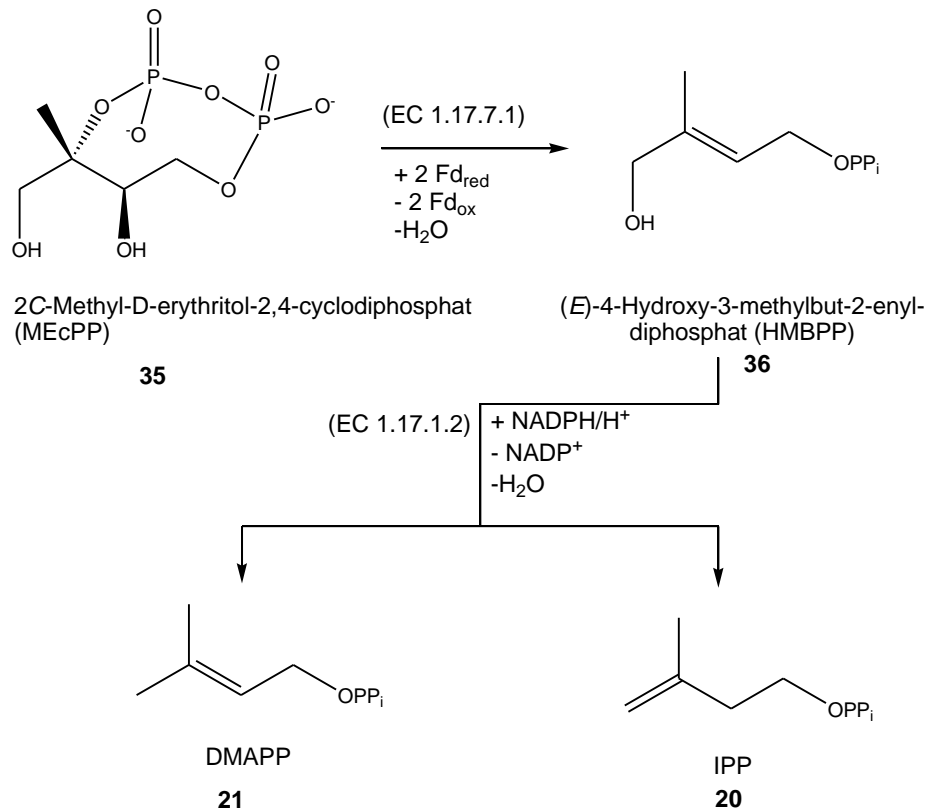


Abbildung 18: Biosynthese von DMAPP (21) und IPP (20) aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (35). (Fd_{red} = Ferredoxin (reduzierte Form), Fd_{ox} = Ferredoxin (oxidierte Form))

2.3.1.3 Bildung der Terpenvorstufen Geranyl- und Farnesylpyrophosphat

DMAPP (21) reagiert in einer 1'-4-Kondensation mit IPP (20) zu Geranylpyrophosphat (GPP, 37) [41]. GPP ist die Vorstufe aller Monoterpene (Abbildung 19).

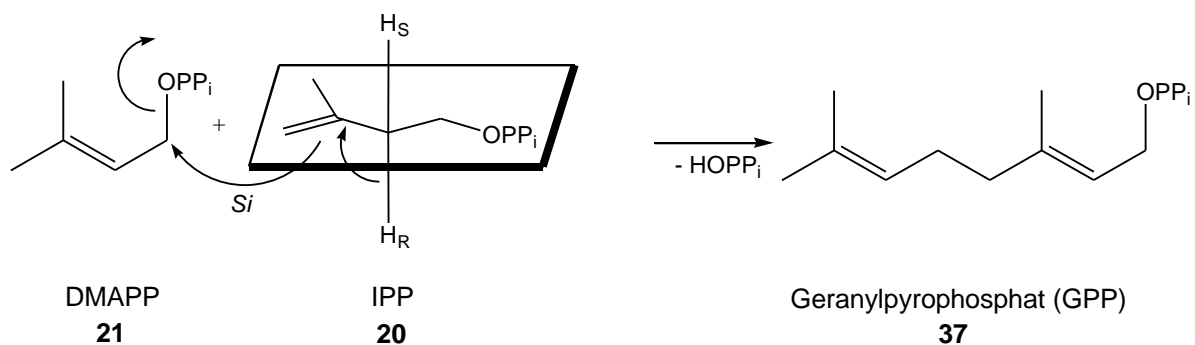


Abbildung 19: Kondensation von DMAPP (21) und IPP (20) zu GPP (37) nach [25], [41]

Das GPP kondensiert mit einem weiteren Molekül IPP nach dem gleichen Mechanismus zu Farnesylpyrophosphat (FPP, 38) [41]. FPP ist die Vorstufe aller Sesquiterpene (Abbildung 20).

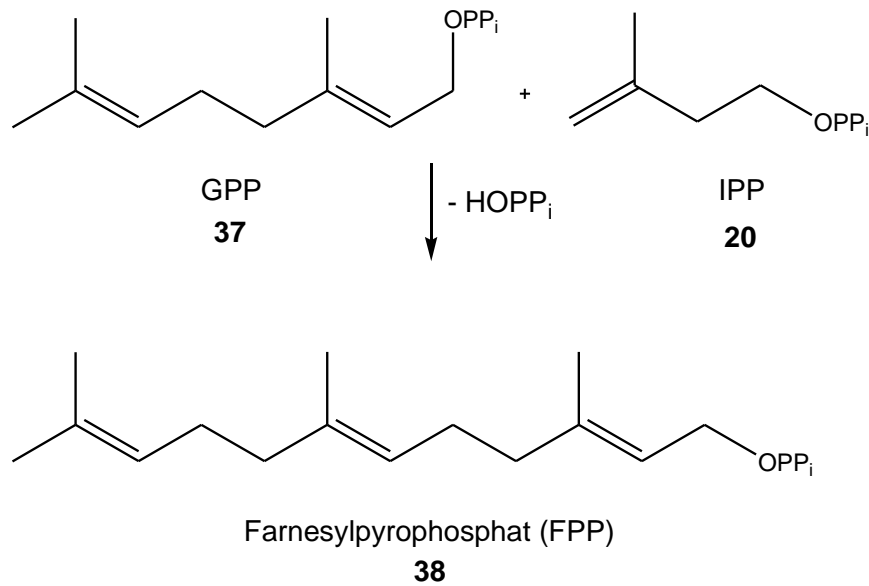


Abbildung 20: Kondensation von GPP (37) und IPP (20) zu FPP (38) (nach [25], [41])

2.3.1.4 Bildung von Monoterpenen aus Geranylpyrophosphat

Bislang sind über 1000 Monoterpene gefunden worden, die über unterschiedliche Cyclisierungen, Umlagerungen und Funktionalisierungen alle aus GPP als gemeinsamer biosynthetischer Vorstufe hervorgehen [42]. GPP (37) kann aufgrund seiner (*E*)-Doppelbindung nicht direkt cyclisieren, da die räumliche Anordnung der Reste dies verhindert. Es lagert zunächst enzymkatalysiert zu den beiden Enantiomeren (3*R*)-Linalyldiphosphat (39) und (3*S*)-Linalyldiphosphat (40) um [43] (Abbildung 21).

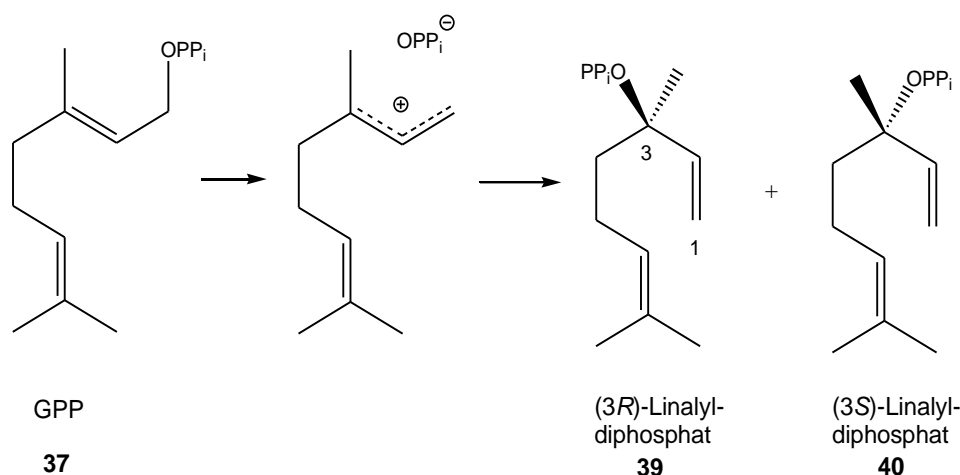


Abbildung 21: Umlagerung von GPP (37) zu (3*R*)-Linalyldiphosphat (39) und (3*S*)-Linalyldiphosphat (40)

Diese cyclisieren anschließend zu den (4*R*)- α -Terpin-8-yl- und (4*S*)- α -Terpin-8-yl-Kationen (41 und 42), zentralen Zwischenstufen für die Biosynthese der (+)- und (-)-Monoterpene [44] (Abbildung 22).

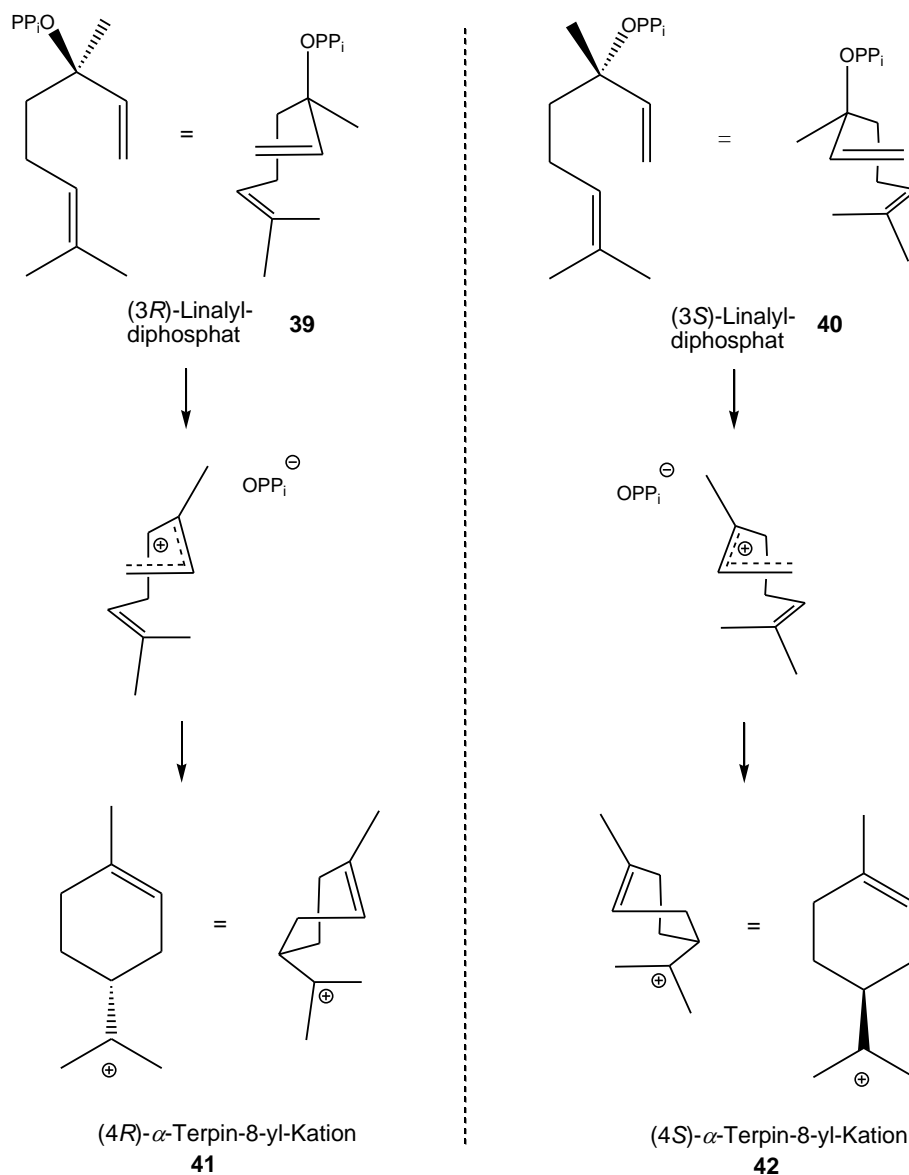


Abbildung 22: Stereochemischer Verlauf der Cyclisierung von (3R)-Linalyldiphosphat (39) und (3S)-Linalyldiphosphat (40) zum (4R)- α -Terpin-8-yl- (41) und (4S)- α -Terpin-8-yl-Kation (42) nach D. C. Hyatt, R. Croteau [44]

Aus dem (4S)- α -Terpin-8-yl-Kation werden nach den in Abbildung 23 dargestellten Mechanismen die Monoterpene (4S)-(-)-Limonen (**43**), (-)- α -Pinen (**49**), (-)- β -Pinen (**50**), (-)-Borneol (**45**), sowie Camphen (**47**) synthetisiert [44, 45]. (-)-Borneol kann zu Bornylacetat (**51**) acetyliert werden. Deren (+)-Enantiomere werden nach dem entsprechenden Mechanismus aus dem (4R)- α -Terpin-8-yl-Kation synthetisiert.

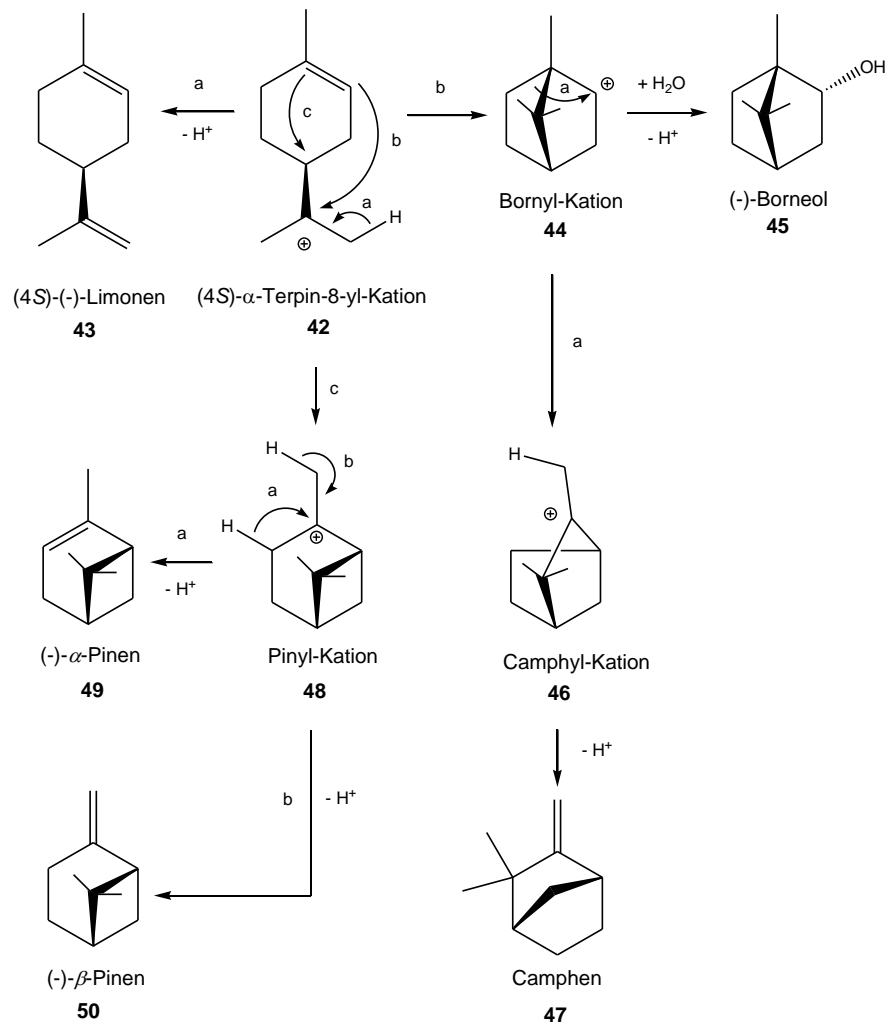


Abbildung 23: Biosynthese der Monoterpene 43 – 50 aus dem (4S)-α-Terpin-8-yl-Kation (42) nach [25, 44, 45]

2.3.1.5 Bildung von Sesquiterpenen aus Farnesylpyrophosphat

Alle Sesquiterpene werden *in vivo* aus Farnesylpyrophosphat (FPP, **38**) synthetisiert. Aus FPP (**38**) kann ein Pyrophosphat-Anion abgespalten werden, wonach das resonanzstabilisierte Farnesyl-Kation (**52**) entsteht, das die Zwischenstufe der Cyclisierung von FPP (**38**) ist (Abbildung 24).

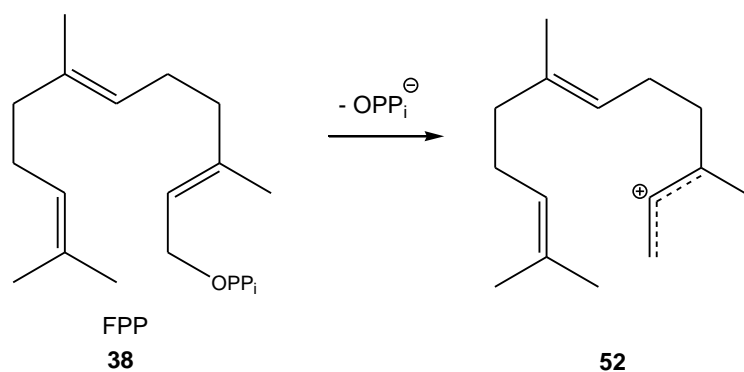


Abbildung 24: Bildung des Farnesyl-Kations 52 aus FPP (38)

Das monocyclische Sesquiterpen Germacren D (**53** bzw. **54**) ist die Vorstufe in der Biosynthese vieler Sesquiterpene [46]. C. Schmidt *et al.* zeigten [47], dass in der kanadischen Goldrute *Solidago canadensis* (-)-Germacren D (**53**) durch Cyclisierung von FPP (**38**) über das (7*R*)-Germacradien-11-yl-Kation (**55**) mit nachfolgendem 1,3-Hydrid-Shift synthetisiert wird, wohingegen (+)-Germacren D (**54**) entsteht, wenn nach der Cyclisierung des FPP zwei 1,2-Hydrid-Shifts erfolgen (Abbildung 25).

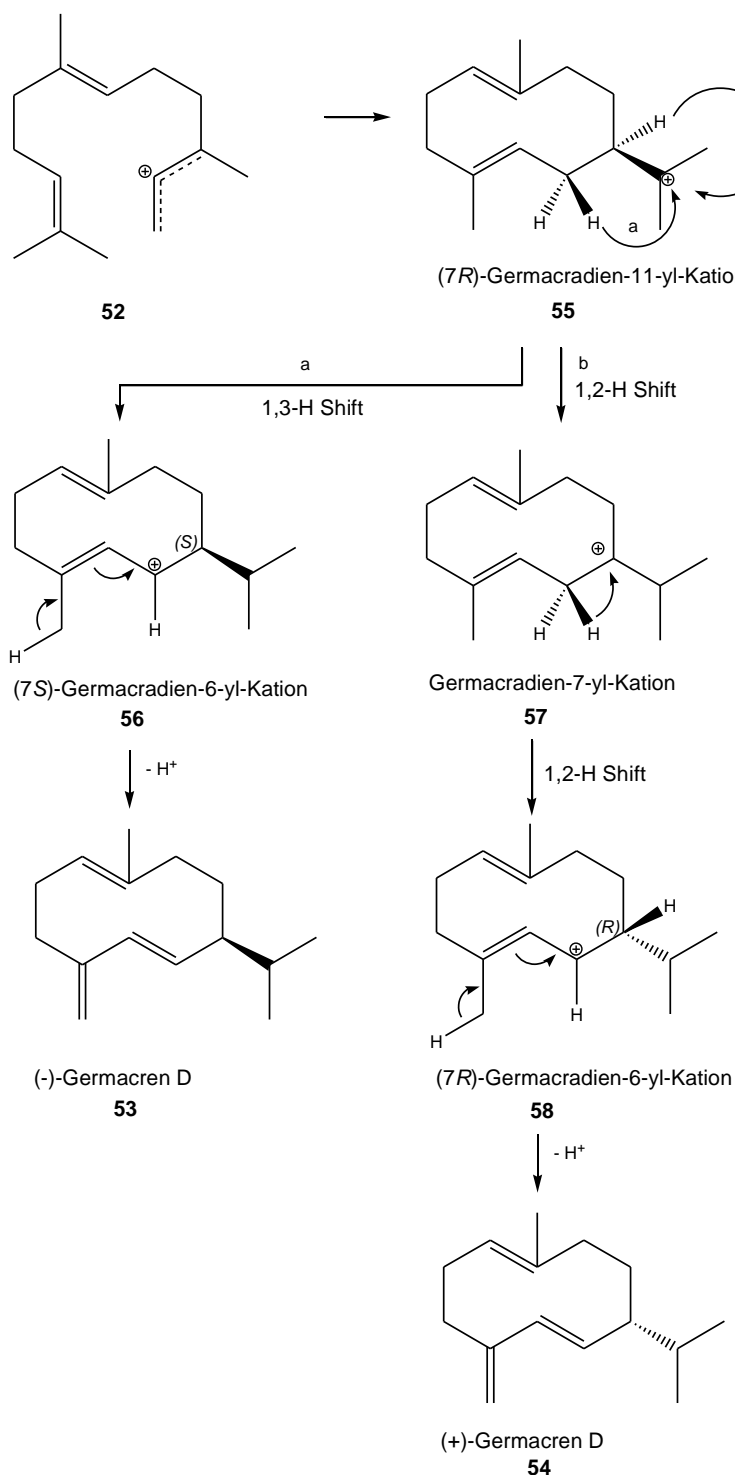


Abbildung 25: Bildung von Germacren D aus dem Farnesyl-Kation (**52**)

Die Biosynthese von α -Humulen (**60**) und *trans*- β -Caryophyllen (**62**) erfolgt ebenfalls aus dem resonanzstabilisierten Kation (**52**), das durch Abspaltung von Pyrophosphat aus FPP entsteht (Abbildung 26).

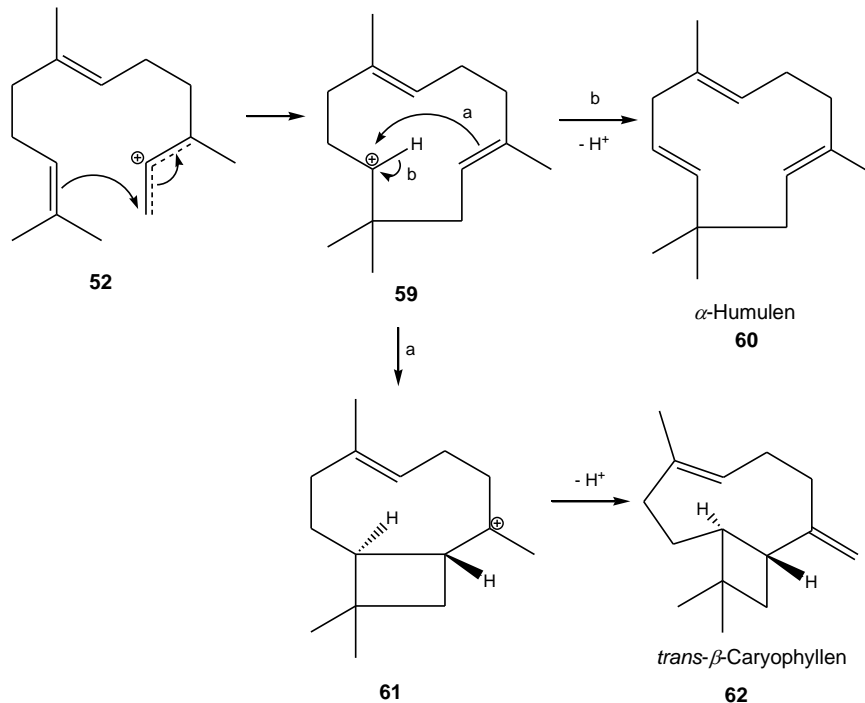


Abbildung 26: Biosynthese von α -Humulen (**60**) und *trans*- β -Caryophyllen (**62**)

2.3.2 Biologische Aktivität von Terpenen

Terpene haben in pflanzlichen Organismen vielfältige Wirkungen: Sie können der direkten und indirekten chemischen Verteidigung dienen, indem sie eine toxische oder fraßhemmende Wirkung haben oder indem sie Entomophagen, also Feinde der Herbivoren, anlocken. Sie können Insekten zur Bestäubung anlocken und sie können im Stoffwechsel als Radikalfänger für Stickstoff- und Sauerstoffradikale wirken [48], sowie die Mineralisierung von Stickstoff verhindern [49].

Flüchtige Monoterpene im Pflanzenduft, wie z.B. Linalool (**63**), Citronellol (**64**), 1,8-Cineol (**64**), (*E*)- β -Ocimen (**66**), Campher (**67**), Myrcen (**68**), α -Pinen (**49**) und β -Pinen (**50**) locken Insekten zur Bestäubung an [50] (Abbildung 27).

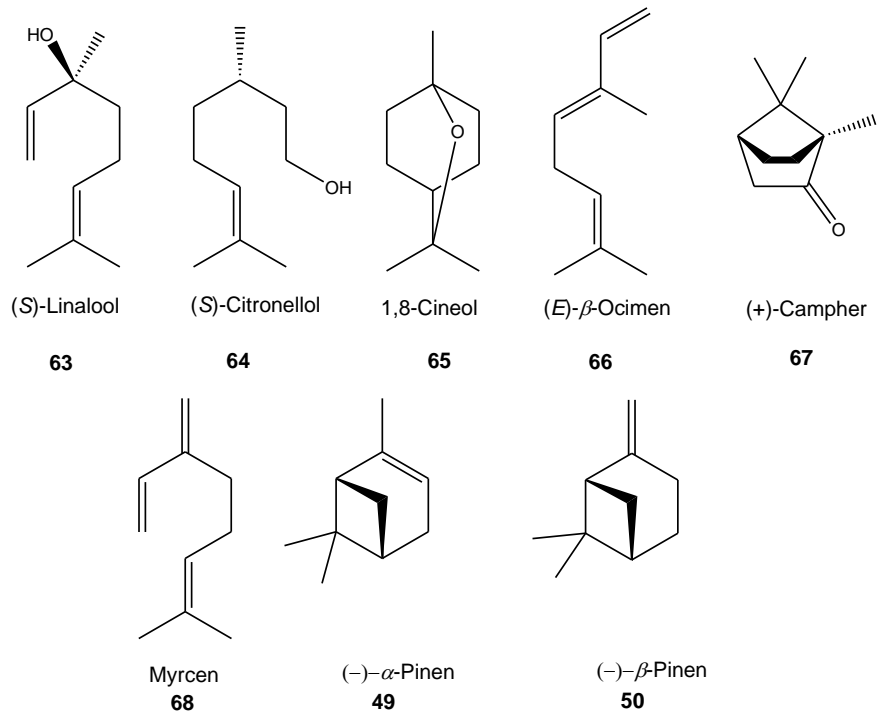


Abbildung 27: Insektenlockstoffe im Pflanzenduft

Einige Monoterpene sind Insektenpheromone. (+)-*cis*-Verbenol (**69**) ist ein Aggregationspheromon für den Buchdrucker *Ips typographus*, der ein Vertreter der Borkenkäfer (*Scolytinae*) ist (Abbildung 28). Wenn sich die Käfer in die Rinde der Wirtsbäume, vor allem Fichten, einbohren, so nehmen sie über ihr Tracheensystem das (-)-α-Pinen (**49**) der Wirtsbäume auf. Sie können dies zu (+)-*cis*-Verbenol (**69**) oxidieren. Sie scheiden dieses mit ihrem Bohrmehl aus und locken damit ihre Artgenossen auf befallene Bäume an [51]. Vitale Nadelbäume wehren einzelne Borkenkäfer durch erhöhten Harzfluss ab. Durch die Masseninvasion der angelockten Individuen wird die Abwehr des Baumes jedoch geschwächt und kann überwunden werden.

Der verwandte Borkenkäfer *Ips duplicatus* oxidiert Myrcen (**68**) aus dem Wirtsbaum zu (*E*)-Myrcenol (**70**) und Ipsdienol (**71**) (Abbildung 28). Diese wirken ebenfalls als Aggregationspheromone und auch als Sexualpheromone zur Anlockung von Weibchen. Das Ipsdienol (**71**) wird in dieser Funktion auch von *Ips typographus* eingesetzt [52, 53].

Die Pheromonwirkung von (+)-*cis*-Verbenol (**69**), (*E*)-Myrcenol (**70**) und Ipsdienol (**71**) auf Borkenkäfer nutzt man in der Forstwirtschaft. Man setzt die Pheromone in Lockstofffallen ein, um diese Forstschädlinge einzufangen [52].

Nach beendeter Paarung, wenn der Wirtsbaum vollständig besiedelt ist, scheidet der Buchdrucker *Ips typographus* (-)-Verbenon (**72**) aus, einen Antagonisten des *cis*-Verbenols (**69**), der Artgenossen auf andere, bisher unbefallene Bäume vertreibt. Dadurch wird eine Übersiedelung des Wirtsbaumes vermieden und die Überlebenschancen der heranwachsenden Brut werden steigen [54].

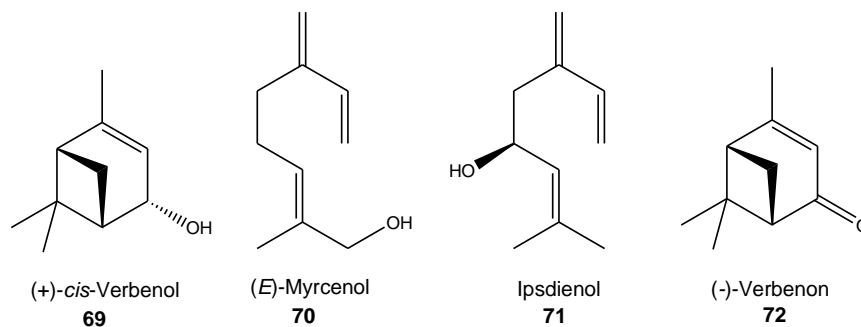


Abbildung 28: Pheromone aus Borkenkäfern der Gattung *Ips*

Die Monoterpene (-)-Fenchon (**73**), (+)-Campher (**67**), (-)-Limonen (**43**), (-)-Menthol (**74**), 1,8-Cineol (**65**), α -Terpineol (**75**) und *p*-Cymen (**76**) wirken bei Begasung toxisch auf Larven von *Spodoptera littoralis* (Abbildung 29).

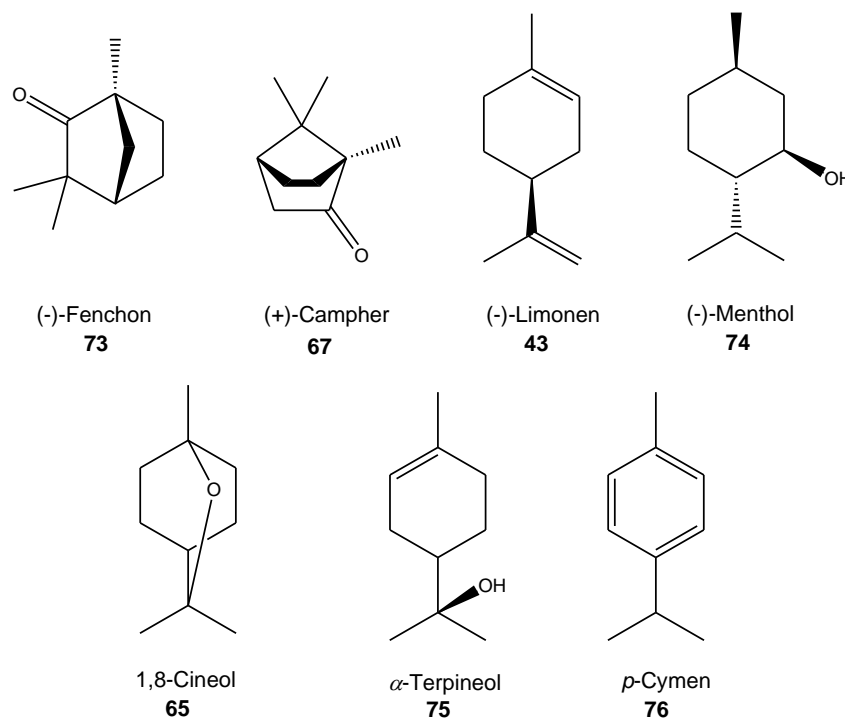


Abbildung 29: Monoterpene mit Toxizität gegen *Spodoptera littoralis* - Larven bei Begasung

Cuminaldehyd (**77**), Geraniol (**78**), (-)-Carvon (**79**) und (-)-Menthol (**74**) sind Kontaktgifte für *Spodoptera littoralis* - Larven [3, 4] (Abbildung 30).

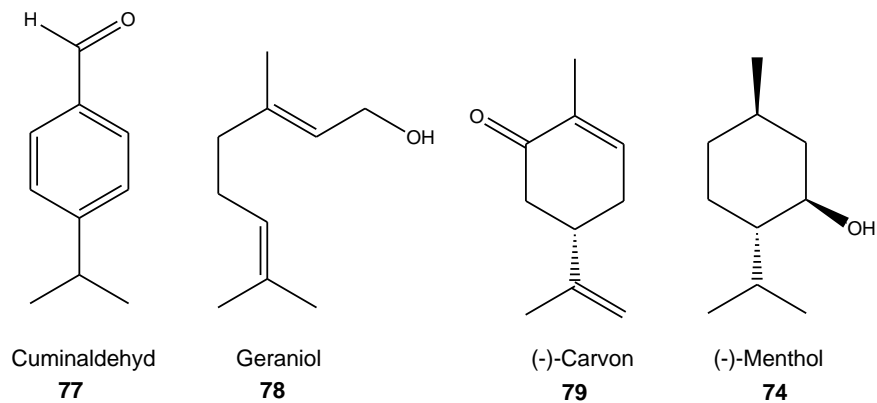


Abbildung 30: Kontaktgifte für *Spodoptera littoralis* – Larven

Aus *Tanacetum argenteum* wurde 8 α -Angeloyloxycostunolid (**80**) isoliert, ein Sesquiterpenlacton vom Germacrantyp. Es wirkt fraßhemmend auf Larven von *Spodoptera littoralis* [55] (Abbildung 31).

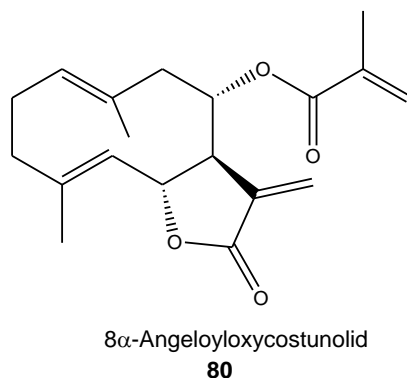


Abbildung 31: Struktur von 8 α -Angeloyloxycostunolid (**80**), einem Fraßhemmer für *Spodoptera littoralis* - Larven

Aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *Tanacetum cadmeum* wurden Artesin (**81**), Tavulin (**82**), Tanachin (**83**) und Tamirin (**84**) isoliert. Diese vier Sesquiterpenlactone (Abbildung 32) wirken ebenfalls fraßhemmend auf Larven von *Spodoptera littoralis* [56].

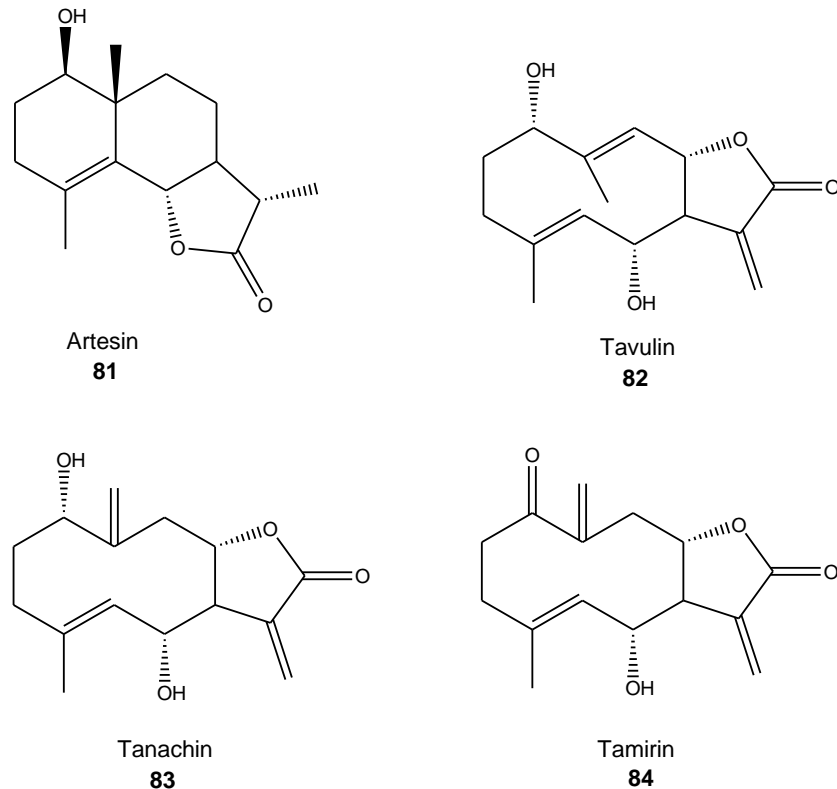


Abbildung 32: Strukturen von Artesin (81), Tavulin (82), Tanachin (83) und Tamirin (84), Fraßhemmern für *Spodoptera littoralis* – Larven

Die letztgenannten Beispiele zeigen, dass *Tanacetum* Spezies Sesquiterpenlactone zur konstitutiven chemischen Verteidigung einsetzen.

Aus Blättern der Sträucher *Encelia asperifolia* und *Encelia actoni* wurde ein weiteres Sesquiterpenlacton, das Encelin (**85**) isoliert. Es wirkt akut toxisch ($LD_{50} = 111 \text{ mg kg}^{-1}$) und in geringeren Konzentrationen ($< 1 \text{ } \mu\text{g / g}$ Nahrung) fraßhemmend auf Larven von *Spodoptera littoralis* [57] (Abbildung 33).

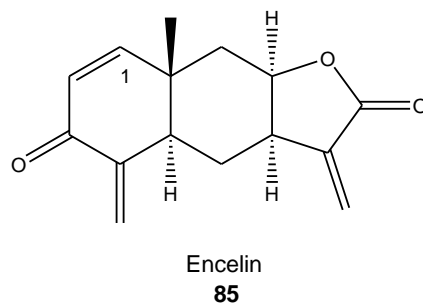
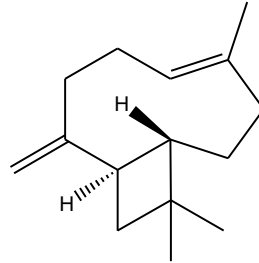


Abbildung 33: Struktur von Encelin (85), einem Fraßhemmer für *Spodoptera littoralis* - Larven

Maispflanzen *Zea mays* setzen *trans*- β -Caryophyllen (**62**) frei, wenn sie von Larven des westlichen Maiswurzelbohrers *Diabrotica virgifera* angefressen werden. Dieses

Sesquiterpen wirkt als Signalstoff und lockt insektenfressende Nematoden zu den befallenen Wurzeln [58, 59] (Abbildung 34).



trans- β -Caryophyllen

62

Abbildung 34: Struktur von *trans*- β -Caryophyllen (62)

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analyse des Regurgitats von *Spodoptera littoralis* - Larven

Durch Ausfällen der Proteine mit Methanol wurde aus dem Rohregurgitat von *Spodoptera littoralis* – Larven ein proteinfreier Rohextrakt erhalten. Dieser wurde im nächsten Schritt durch Festphasenextraktion vorfraktioniert. Dazu wurde mit 2 ml reinem Wasser, 2 ml einer wässrigen 50 %-igen Acetonitrillösung und schließlich mit 2 ml Acetonitril eluiert. Die Fraktionen erhielten dem Acetonitril-Anteil entsprechend die Bezeichnungen F0, F50 und F100 (Abbildung 41) [24, 25].

Voruntersuchungen in unserem Labor zur Elicitierung von Duftstoffen bei Rainfarn mit diesen Fraktionen ergaben [24, 25], dass die Auslösung der Duftstoffemission mit den Fraktionen F0 und F100 des Regurgitatextraktes gelang.

Aus den bisherigen Untersuchungen war auch zu entnehmen, dass bei Fraß von *Spodoptera littoralis* - Larven nur bestimmte Monoterpene und Sesquiterpene im Duft des Rainfarns eliciert werden, das heißt in signifikant erhöhter Konzentration abgegeben werden. Diese sind in den Abbildungen 53 (Abschnitt 3.2.1) und 72 (Abschnitt 3.2.2) gezeigt. Nur die Konzentrationen dieser Terpene im Duft sind also für den Nachweis von Elicitierungsaktivitäten relevant.

In eigenen Voruntersuchungen zur Duftstoffemission des Rainfarns (CLSA-Messungen) konnte ich zeigen, dass die durch Raupenfraß induzierte erhöhte Abgabe aller relevanten Terpene durch Applikation der Regurgitatfraktion F0 induziert werden kann.

In den Abbildungen 35-38 ist ein Vergleich der Konzentrationen der abgegebenen Terpene (ng Terpen / g Frischmasse der Pflanze) zwischen mechanisch verletzten Pflanzen und mechanisch verletzten Pflanzen, die mit der Regurgitatfraktion F0 behandelt wurden, dargestellt. Dazu wurden frisch geerntete Rainfarnpflanzen verletzt und mit ihren Stielen in die wässrige Regurgitatfraktion F0 eingetaucht.

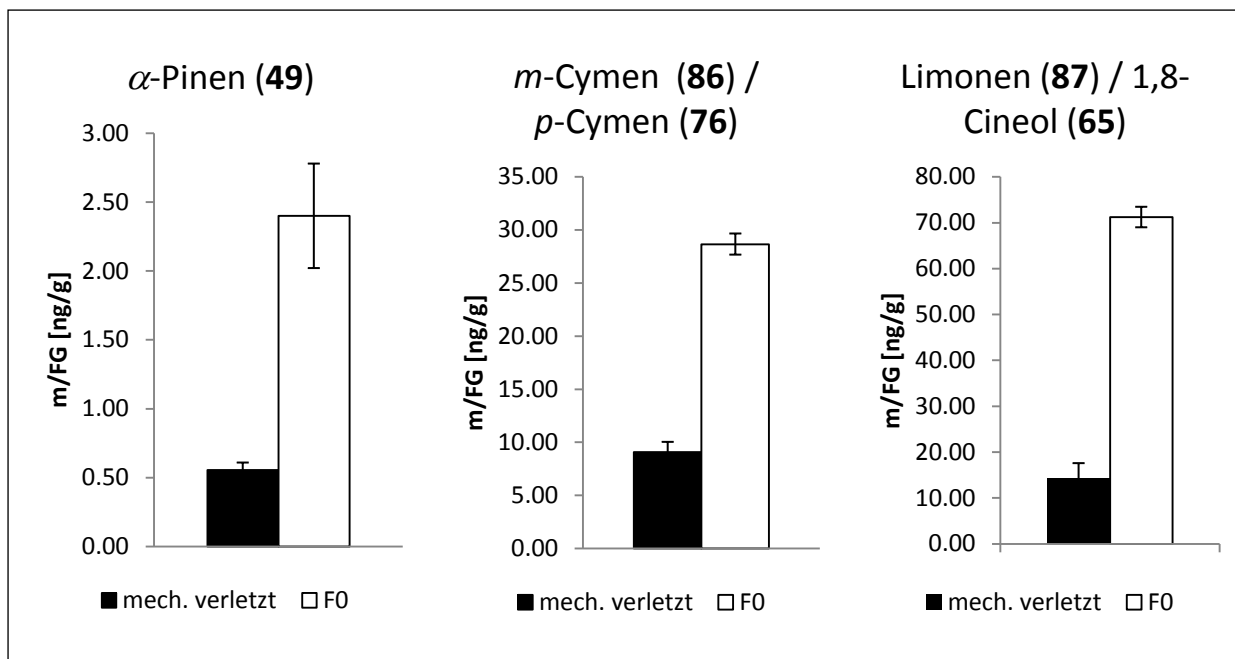


Abbildung 35: Elicitoraktivitäten der Regurgitatfraktion F0 für die Monoterpene α -Pinen, *m*-Cymen / *p*-Cymen, sowie Limonen / 1,8-Cineol – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen nach Aufnahme von Lösung der Fraktion F0 durch verletzte Pflanzen (F0) mit denen von mechanisch verletzten Kontrollpflanzen in Wasser (mech. verletzt)

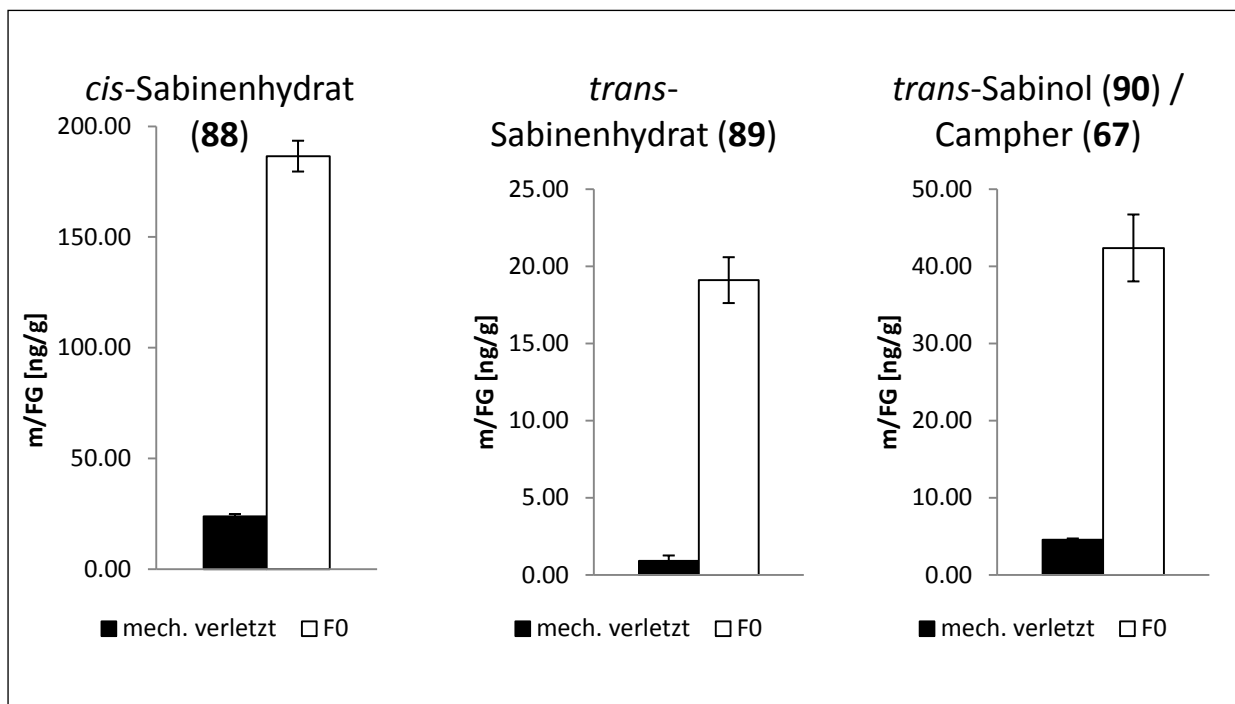


Abbildung 36: Elicitoraktivitäten der Regurgitatfraktion F0 für die Monoterpene *cis*-Sabinenhydrat, *trans*-Sabinenhydrat, sowie *trans*-Sabinol / Campher – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen nach Aufnahme von Lösung der Fraktion F0 durch verletzte Pflanzen (F0) mit denen von mechanisch verletzten Kontrollpflanzen in Wasser (mech. verletzt)

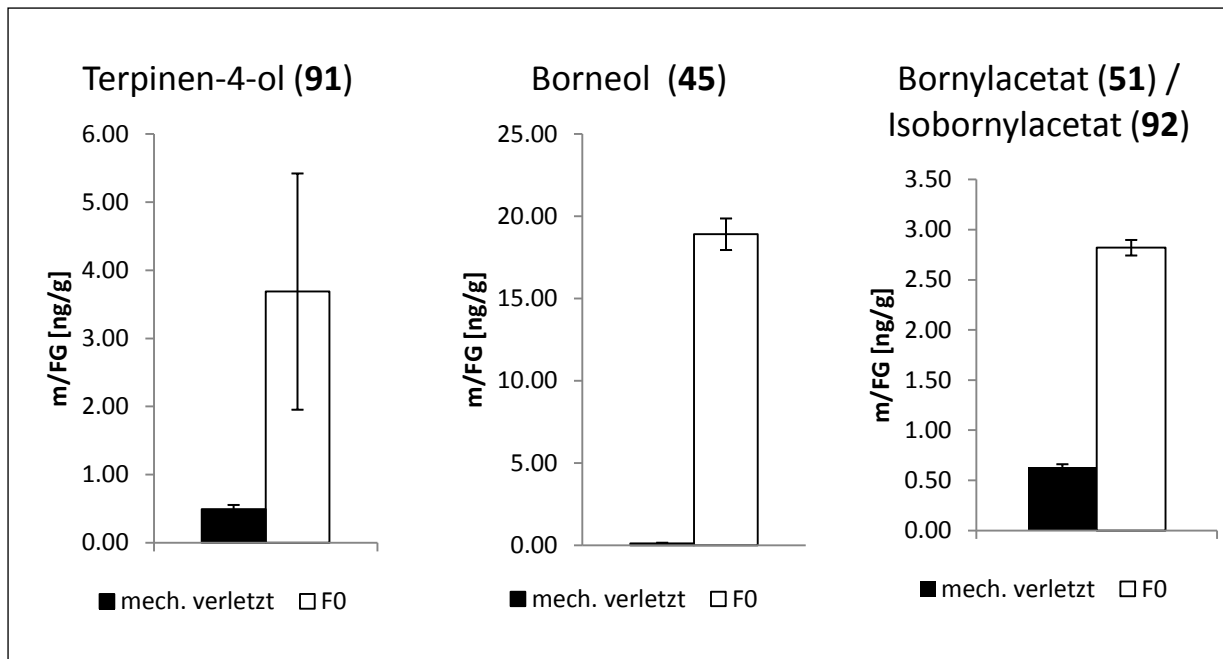


Abbildung 37: Elicitoraktivitäten der Regurgitatfraktion F0 für die Monoterpene Terpinen-4-ol, Borneol, sowie Bornylacetat / Isobornylacetat – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen nach Aufnahme von Lösung der Fraktion F0 durch verletzte Pflanzen (F0) mit denen von mechanisch verletzten Kontrollpflanzen in Wasser (mech. verletzt)

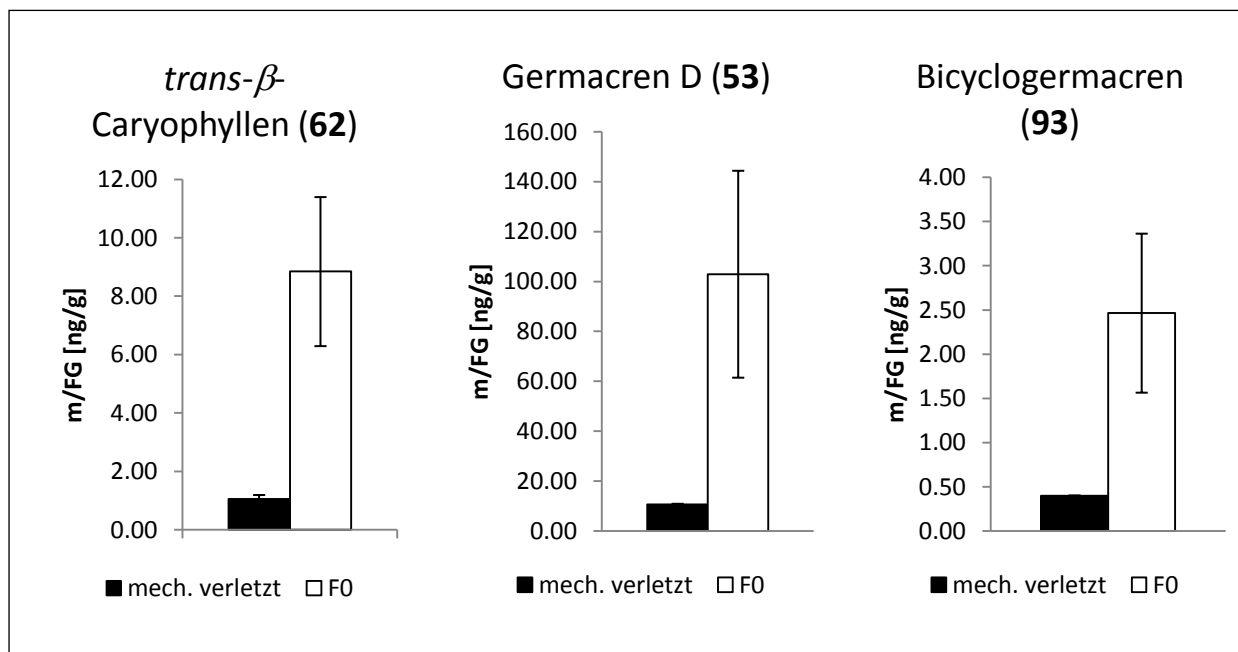


Abbildung 38: Elicitoraktivitäten der Regurgitatfraktion F0 für die Sesquiterpene *trans*-β-Caryophyllen, Germacren D und Bicyclogermacren – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen nach Aufnahme von Lösung der Fraktion F0 durch verletzte Pflanzen (F0) mit denen von mechanisch verletzten Kontrollpflanzen in Wasser (mech. verletzt)

Diese Resultate zeigen, dass nach den Elicitoren der Duftstoffemission des Rainfarns vorrangig in der Regurgitatfraktion F0 zu suchen ist. Weiterhin kann mit der Regurgitatfraktion F100 [24, 25] vor allem die Emission von Sesquiterpenen ausgelöst werden.

Aufgrund der schwierigen Trennbarkeit des Vielstoffgemischs in der Regurgitatfraktion F100 durch HPLC [24, 25] und aufgrund der sehr geringen Substanzmengen in dieser Fraktion im Vergleich zur Fraktion F0 erschien eine Isolierung und Charakterisierung von Elicitoren schwierig.

Angesichts der Zielsetzung dieser Arbeit (siehe Abschnitt 1.2), einzelne Elicitoren zu isolieren und strukturell zu charakterisieren, die die Abwehrreaktion bei Raupenfraß hervorrufen, konzentrierten sich meine Untersuchungen daher auf die Analyse der Regurgitatfraktion F0. Dies bedeutete die Isolierung, die spektroskopische Analyse und den Aktivitätsnachweis für die in F0 enthaltenen Elicitoren. Dementsprechend wurde zunächst die Fraktion F0 des Regurgitats von *Spodoptera littoralis* - Larven durch HPLC aufgetrennt.

3.1.1 HPLC-Trennungsgang

Polare organische Analyten werden in der Regel durch Reversed Phase – HPLC getrennt. Eine RP - HPLC der Fraktion F0 an einer Octadecyl-Phase (RP18) führte jedoch zu keiner befriedigenden Trennung, da die Analyten so polar waren, dass sie bereits in reinem Wasser nach wenigen Minuten eluierten (Abbildung 39).

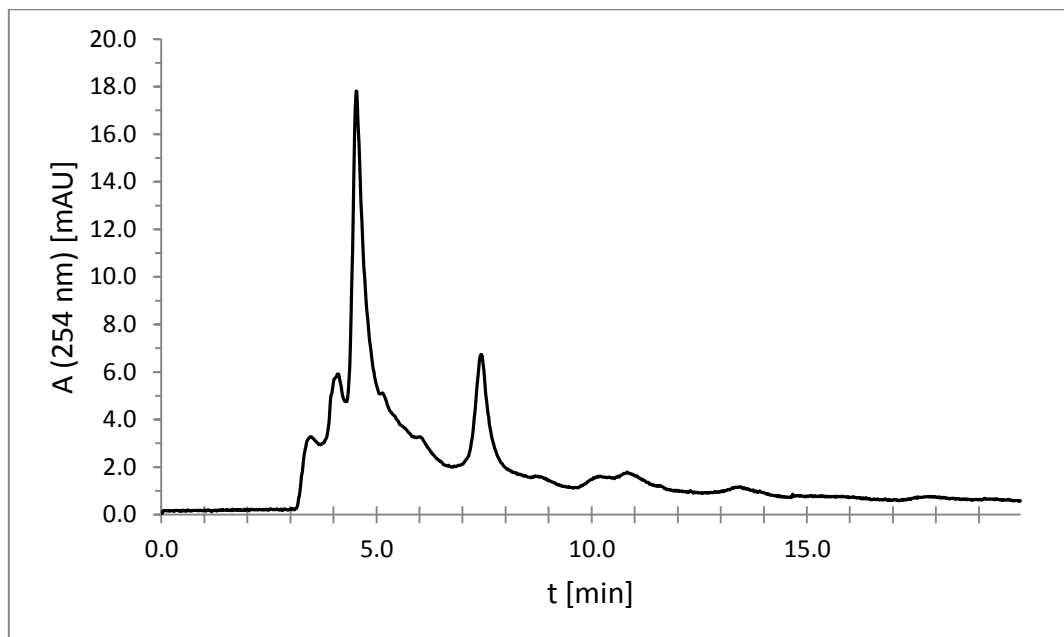


Abbildung 39: Reversed Phase HPLC der Fraktion F0 (RP18) ($\lambda = 254$ nm)
Knauer Eurospher 100-C18, 3,0 μ m, 250x4,0 mm Säule, Raumtemp., 0,4 ml/min, H₂O

Daher wurde nach einer alternativen Trennmethode gesucht. Ein ^1H -NMR-Spektrum der Gesamtfraktion F0 ließ vermuten, dass es sich bei den Komponenten in F0 um Glykoside handelte, die charakteristische Signale in dem Bereich $\delta = 3,20 - 5,40$ ppm zeigten.

Für die Trennung von Oligosacchariden durch HPLC wurden Diaminopropyl-modifizierte polare Kieselgelphasen entwickelt [60]. Tatsächlich ergab die HPLC an einer Diaminopropyl-modifizierten Phase eine deutlich verbesserte Trennung (Abbildung 40). In der HPLC der Fraktion F0 konnten bei $\lambda = 210$ nm 6 Signale detektiert werden. Dementsprechend wurden 6 Fraktionen F0/1 bis F0/6 gesammelt. Jedoch waren die Signale für F0/1 und F0/2, sowie für F0/5 und F0/6 nicht basisliniensepariert. Hier waren also Substanzgemische zu erwarten. Mit diesen Fraktionen wurden dann Biotests zur Elicitierung von Duftstoffen an Rainfarn durchgeführt.

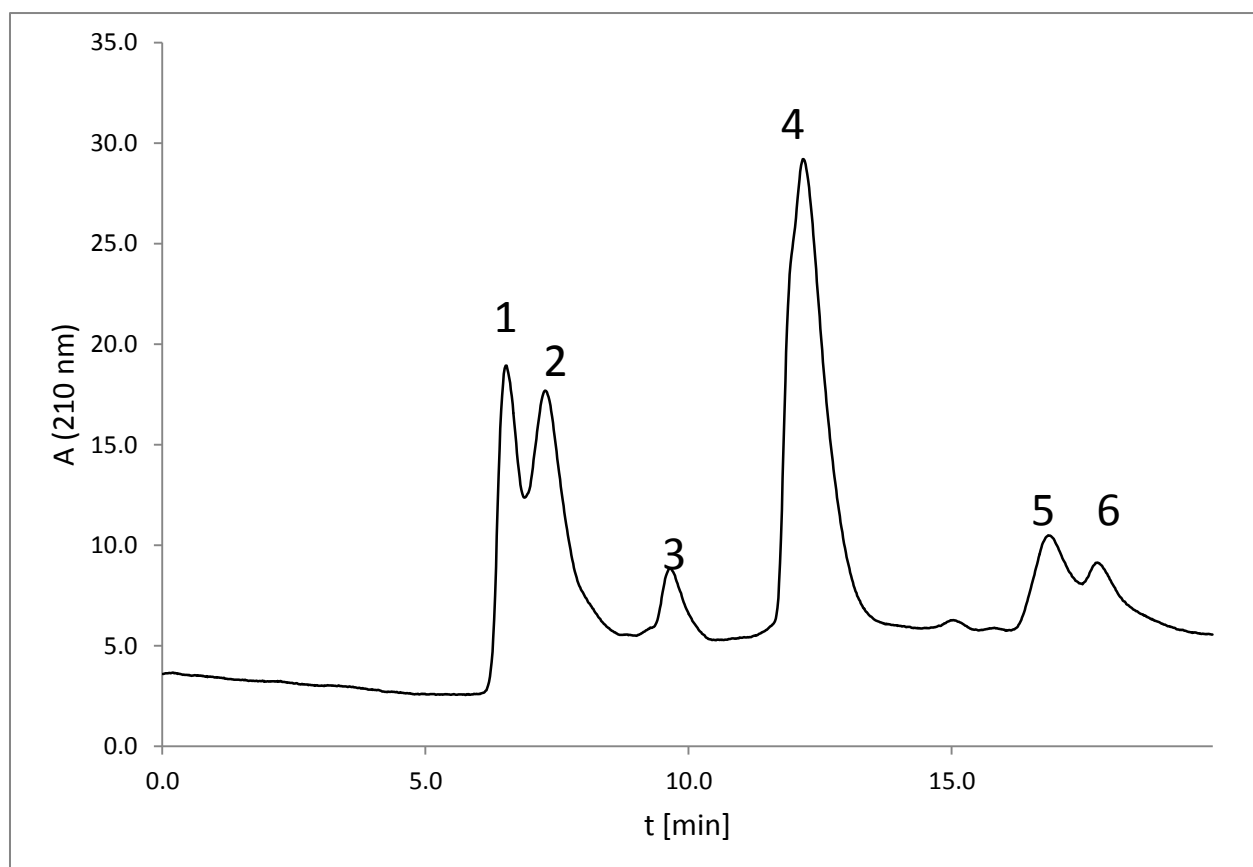


Abbildung 40: HPLC der Fraktion F0 ($\lambda = 210$ nm)

Macherey & Nagel Nucleosil 100-NH₂, 5,0 μm , 250x4,6 mm Säule, Raumtemp., 0,8 ml/min, MeOH/H₂O 85:15

Eine Übersicht des gesamten Trennungsgangs ist in Abbildung 41 dargestellt.

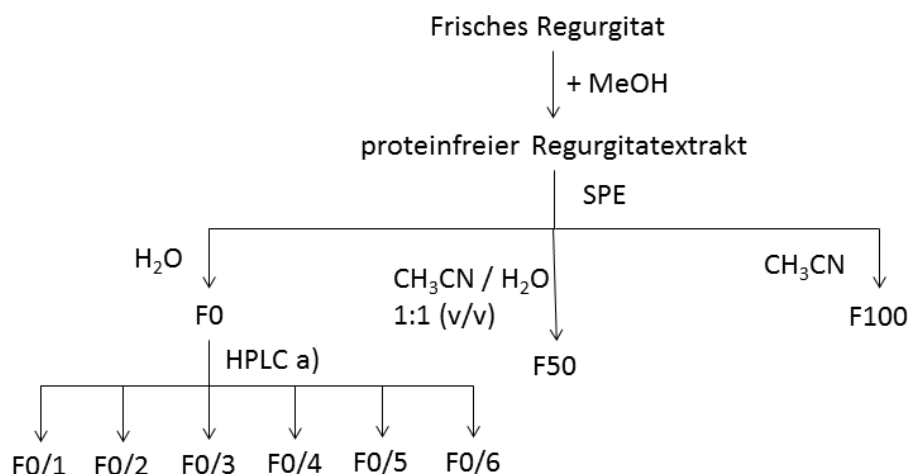


Abbildung 41: Übersicht über den Trennungsgang für das Regurgitat von *Spodoptera littoralis*.

HPLC a) Macherey & Nagel Nucleosil 100-NH₂, 5,0 μ m, 250x4,6 mm Säule, Raumtemp., 0,8 ml/min, MeOH/H₂O 85:15 ; SPE = Festphasenextraktion mit Chromabond ec Polypropylensäulen mit 500 mg Festphase und V = 6 ml

3.1.2 Charakterisierung der HPLC-Fractionen

3.1.2.1 NMR-Spektroskopie von Fraktion F0/6

Die Fraktion F0 wurde mit Wasser/Methanol 85:15 extrahiert und dabei wurde ein Rückstand erhalten, der das angereicherte Substanzgemisch F0/6 darstellt, was durch HPLC überprüft wurde. Von der auf diese Weise erhaltenen Fraktion F0/6 wurden ¹H-, ¹H-¹H-COSY-, TOCSY-, NOESY-, ¹³C-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen. Obwohl es sich um ein Multisaccharidgemisch handelte, konnte das Oligosaccharid Stachyose (**96**, Abbildung 49) identifiziert werden.

Im ¹H-NMR Spektrum von F0/6 wurden Signale bei δ 4,89 (d, J = 3,8 Hz, H-1 Gal i, H-1 Gal e) und 5,32 (d, J = 3,7 Hz, H-1 Glc) beobachtet (Tabelle 1), die für α -glycosidische anomere Protonen der Galaktose intern, Galaktose endständig und Glucose charakteristisch sind (Abbildung 49). Das ¹H-NMR Signal bei δ 4,89 zeigte zwei HSQC-Korrelationen zu δ 98,3 (C-1, Gal i) und 97,9 (C-1, Gal e) und das ¹H-NMR Signal bei δ 5,32 (H-1 Glc) zu δ 92,0 (C-1 Glc).

Für das ¹H-NMR Signal bei δ 5,32 (H-1 Glc) wurden TOCSY-Korrelationen zu den Signalen bei δ 3,45, 3,47, 3,63, 3,66, 3,77 und 3,97 gefunden. Im ¹H-¹H-COSY

wurden Kreuzsignale für H-1 Glc/H-2 Glc (δ 3,47), H-2 Glc/H-3 Glc (δ 3,63) beobachtet. Das HSQC-Spektrum lieferte ausgehend von den TOCSY- und ^1H - ^1H -COSY-Korrelationen die ^{13}C Verschiebungen für C-2 Glc δ 70,9, C-3 Glc δ 72,6 und C-4 Glc – C-6 Glc, die durch Vergleich der ^{13}C -Verschiebungen mit Glucose in Raffinose (**95**) (Abbildung 47) [61] zugeordnet wurden. Die HMBC-Korrelationen H-1 Gal i (δ 4,89, d, $J = 3,8$ Hz)/C-6 Glc (δ 65,8) und H-1 Gal e (δ 4,89, d, $J = 3,8$ Hz)/C-6 Gal i (δ 66,4) beweisen die α -1,6-glycosidischen Bindungen zwischen Galaktose intern und Glucose bzw. Galaktose endständig und Galaktose intern.

Der Kreuzpeak H-1 Glc (δ 5,32, d, $J = 3,7$ Hz)/C-2 Fru (δ 103,7) bestätigte die α -1,2-glycosidische Verknüpfung zwischen Glucose und Fructose. Die übrigen ^1H - und ^{13}C -Signale von Fructose wurden durch Vergleich der ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen von Fructose in Raffinose [61] ermittelt.

Nach Auswertung dieser NMR-Daten konnte angenommen werden, dass es sich um das Tetrasaccharid Stachyose (**96**) (Abbildung 49) handelt. Der Vergleich der gemessenen ^{13}C chemischen Verschiebungen von Stachyose mit publizierten Werten [62] zeigte nach Berücksichtigung unterschiedlicher Eichung (von den Literaturwerten wurden jeweils 2,9 ppm subtrahiert) eine sehr gute Übereinstimmung (Tabelle 1).

Im ^{13}C -NMR Spektrum von F0/6 wurden außerdem Signale mit chemischen Verschiebungen beobachtet, die im gleichen Bereich wie Stachyose (**96**) lagen. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um Homologe von Stachyose wie Saccharose (**94**) (Abbildung 45), Raffinose (**95**) und Verbascose (**97**) (Abbildung 51) handeln könnte. Dieser Annahme wurde deshalb mit HPLC- und HPLC/ESI-MS Untersuchungen nachgegangen.

	^1H	^{13}C	^{13}C [62]		^1H	^{13}C	^{13}C [62]
1 Fruc	3,58	61,0	61,3	1 Gal i	4,89 (d, 3,8 Hz)	98,3	98,3
2	-	103,7	103,7	2		68,3	68,3
3	4,11	76,3	76,2	3		69,4	69,2
4	3,95	73,9	73,9	4		69,3	69,2
5	3,79	81,2	81,2	5		68,2	68,7
6		62,4	62,4	6		66,4	66,4
1 Glc	5,32 (d, 3,7 Hz)	92,0	92,0	1 Gal e	4,89 (d, 3,8 Hz)	97,9	97,7
2	3,47	70,9	70,9	2		69,1	68,2
3	3,63	72,6	72,6	3		69,3	69,4
4	3,45	69,3	69,4	4		69,3	69,1
5	3,97	71,2	71,2	5		70,8	70,9
6	3,66; 3,77	65,8	65,8	6	3,64	61,3	61,0

Tabelle 1: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von Stachyose (96) in D_2O

3.1.2.2 HPLC und HPLC-ESI-MS von Fraktion F0/6

Um in der HPLC von Fraktion F0/6 die Peaks von Stachyose (96) und möglicherweise vorhandener Saccharose (94) und Raffinose (95) zuordnen zu können wurde eine HPLC-Messung mit einem Standard aus den kommerziell erhältlichen Oligosacchariden durchgeführt (Abbildung 42).

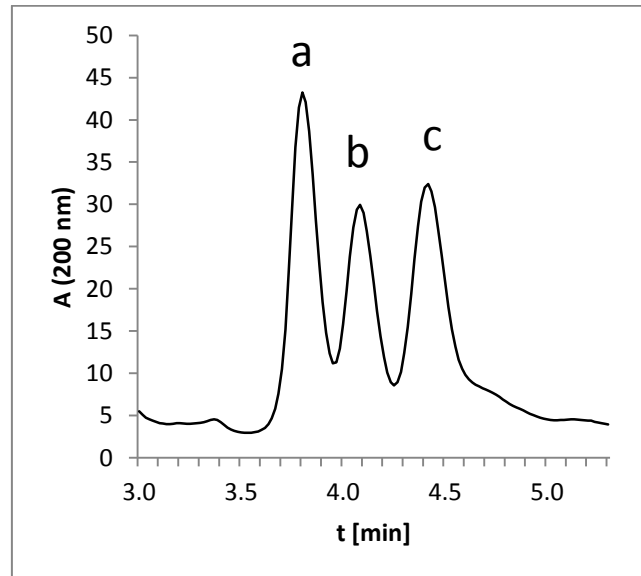


Abbildung 42: HPLC eines Oligosaccharid-Standards ($\lambda=200$ nm)
a: Saccharose (95), b: Raffinose (96), c: Stachyose (97)

Macherey & Nagel Nucleosil 100-NH₂, 5,0 μ m, 250x4,6 mm Säule, Raumtemp., 0,8 ml/min, CH₃CN/H₂O 50:50

Es ergaben sich folgende Retentionszeiten:

Signal	Retentionszeit t [min]	Substanz
a	3,80	Saccharose (94)
b	4,08	Raffinose (95)
c	4,42	Stachyose (96)

Tabelle 2: Retentionszeiten der Oligosaccharide Saccharose (94), Raffinose (95) und Stachyose (96)

Macherey & Nagel Nucleosil 100-NH₂, 5,0 μ m, 250x4,6 mm Säule, Raumtemp., 0,8 ml/min, CH₃CN/H₂O 50:50

Anhand dieser Retentionszeiten wurden in der HPLC von F0/6 (Abbildung 43) die Signale a – c zugeordnet. Verbascose (97, Signal d) wurde durch eine Coinjektion von kommerziell erhältlicher Verbascose mit der präparativ gewonnenen Fraktion F0/6 identifiziert. Verbascose (97) eluiert bei t = 5,08 min von der Säule. Tatsächlich wurde eine deutliche Erhöhung dieses Signals festgestellt (Abbildung 44).

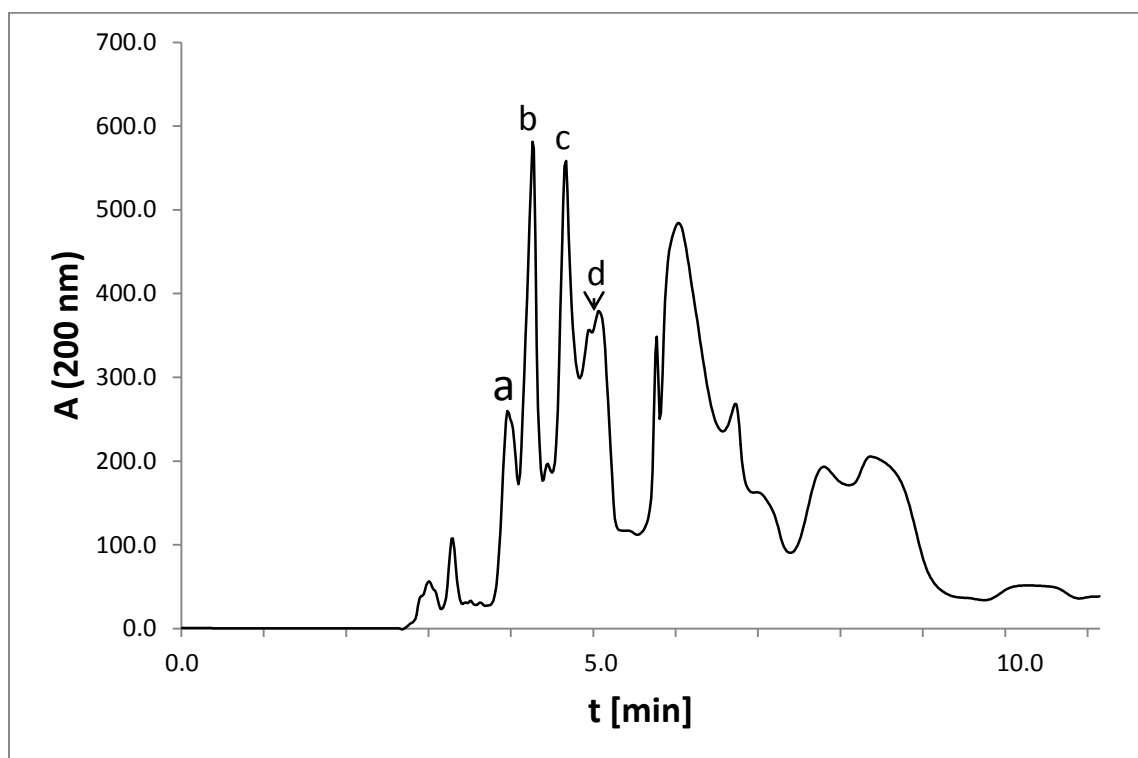


Abbildung 43: HPLC der NMR-Probe von Fraktion F0/6 ($\lambda = 200$ nm)
a: Saccharose (94); b: Raffinose (95); c: Stachyose (96); d: Verbascose (97)

Macherey & Nagel Nucleosil 100-NH₂, 5,0 μ m, 250x4,6 mm Säule, Raumtemp., 0,8 ml/min, CH₃CN/H₂O 50:50

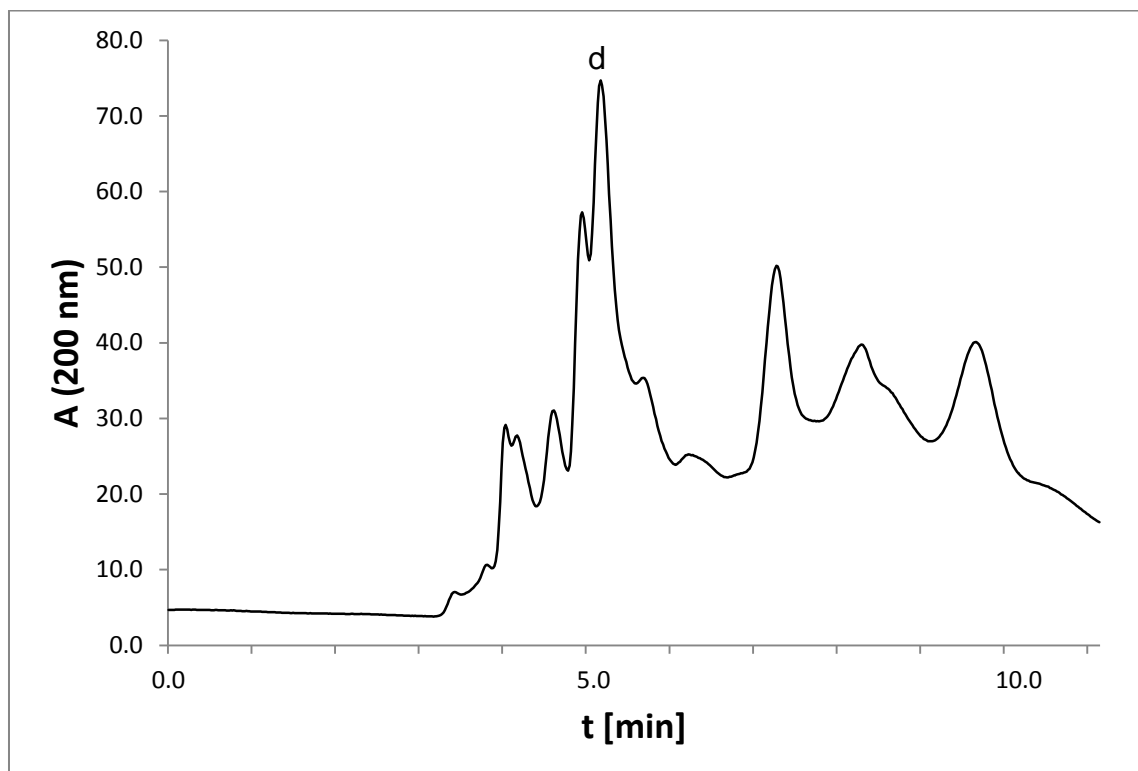


Abbildung 44: HPLC der Fraktion F0/6 nach Coinjektion von Verbascose (d, bei t = 5,08 min)

Macherey & Nagel Nucleosil 100-NH₂, 5,0 μ m, 250x4,6 mm Säule, Raumtemp., 0,8 ml/min, CH₃CN/H₂O 50:50

Die HPLC/ESI-MS Messungen erfolgten an der gleichen Säule, wie die HPLC-Messungen. Bei einer HPLC-Retentionszeit von $t = 4,25$ min eluierte Saccharose (**94**) (Abbildung 45), die im ESI-MS das Natriumaddukt $[M+Na]^+$ mit m/z 365 und das Kaliumaddukt $[M+K]^+$ mit m/z 381 zeigte (Abbildung 46). Weiterhin wurden noch die Fragmentionen mit m/z 179 und 244 ($221+Na$) beobachtet. Das HR-ESI-FT-ICR-MS ergab eine Masse von $[M+K]^+$ mit m/z 381,07940 (berechnet für $[C_{12}H_{22}O_{11}+K]^+$: 381,07937).

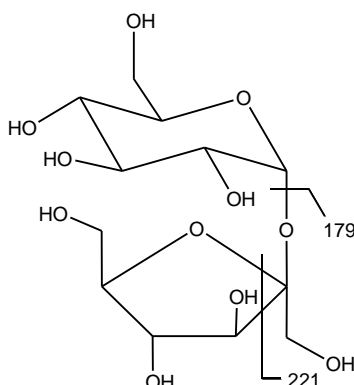


Abbildung 45: Struktur von Saccharose (**94**, $C_{12}H_{22}O_{11}$, $M = 342$) mit MS-Fragmenten 179 und 221

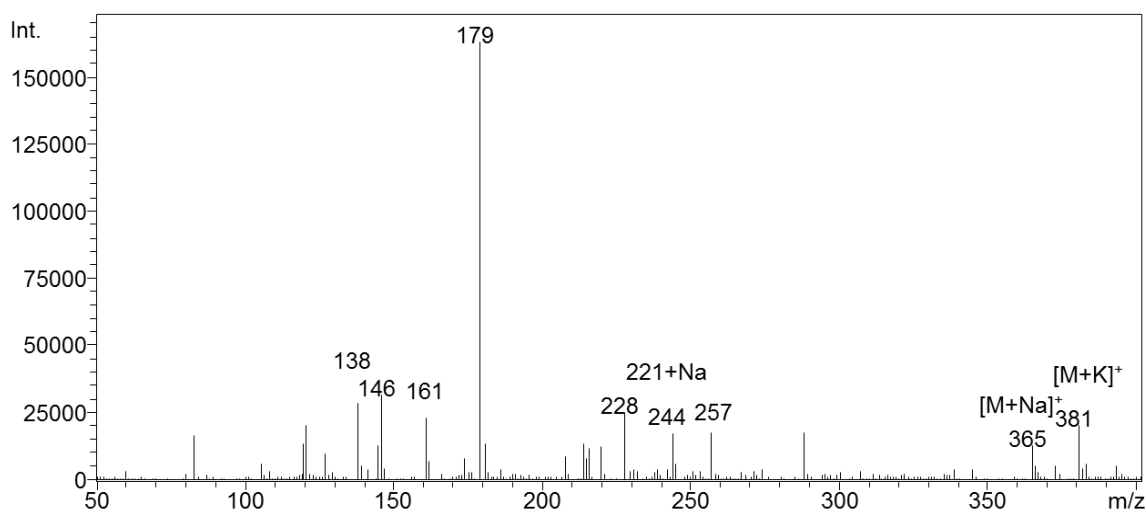


Abbildung 46: Nachweis von Saccharose (**94**) im HPLC/ESI-MS der Fraktion F0/6 bei einer Retentionszeit von $t = 4,25$ min

Für Raffinose (**95**) (Abbildung 47) wurde in der HPLC eine Retentionszeit von $t = 4,62$ min und im ESI-MS das Natriumaddukt $[M+Na]^+$ mit m/z 527, das Kaliumaddukt $[M+K]^+$ mit m/z 543 und die Fragmentionen mit m/z 179, 274 ($251+Na$), 365 ($[M+Na-Hex]^+$) und 381 ($[M+K-Hex]^+$) gefunden (Abbildung 48). Das HR-ESI-FT-ICR-MS ergab eine Masse von $[M+K]^+$ mit m/z 543,13244 (berechnet für $[C_{18}H_{32}O_{16}+K]^+$: 543,13219).

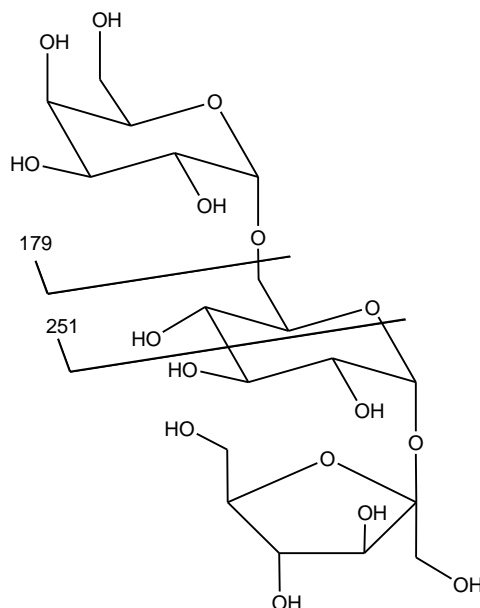


Abbildung 47: Struktur und ESI-MS-Fragmentierung von Raffinose (95, $C_{18}H_{32}O_{16}$, $M = 504$) mit MS-Fragmenten 179 und 251

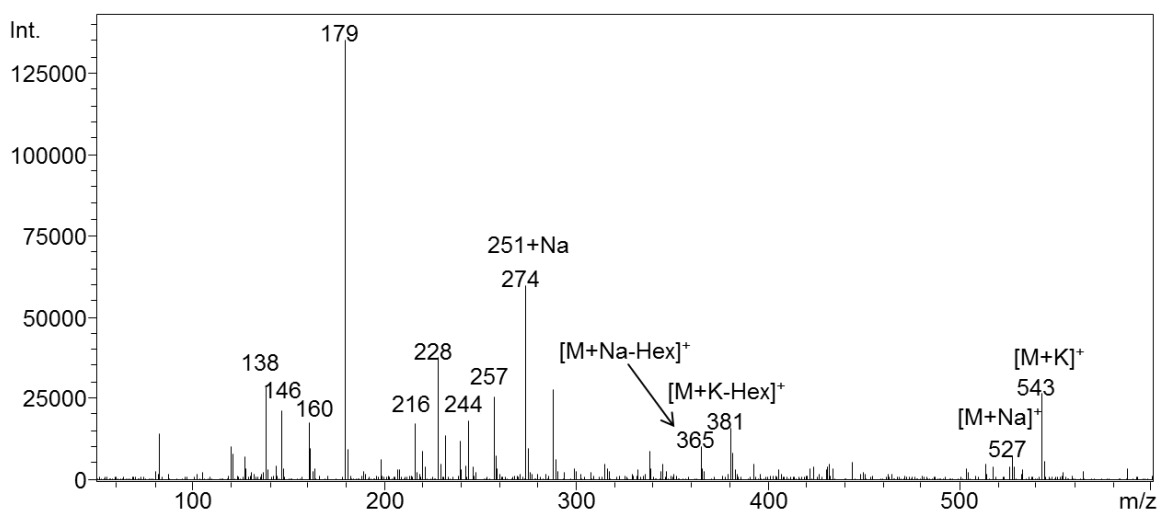


Abbildung 48: Nachweis von Raffinose (95) im HPLC/ESI-MS der Fraktion F0/6 bei einer Retentionszeit von $t = 4,62$ min

Bei einer HPLC-Retentionszeit von $t = 5,51$ min konnte Stachyose (**96**) (Abbildung 49) identifiziert werden, die im ESI-MS das Natriumaddukt $[M+Na]^+$ mit m/z 689 und das Kaliumaddukt $[M+K]^+$ mit m/z 705 zeigte (Abbildung 50). Das HR-ESI-FT-ICR-MS ergab eine Masse $[M+K]^+$ von m/z 705,18489 (berechnet für $[C_{24}H_{42}O_{21}+K]^+$: 705,18502).

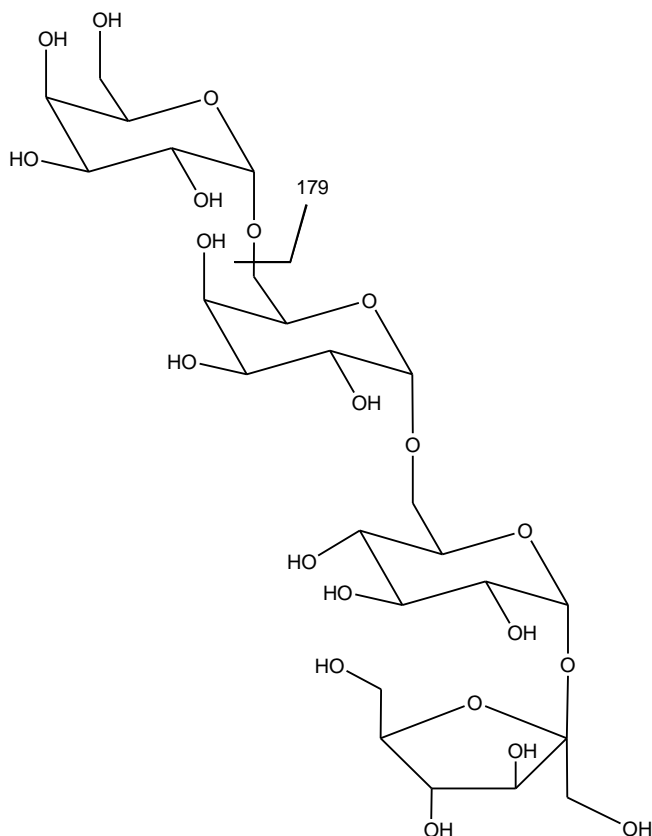


Abbildung 49: Struktur von Stachyose (96, $C_{24}H_{42}O_{21}$, $M = 666$) mit MS Fragment 179

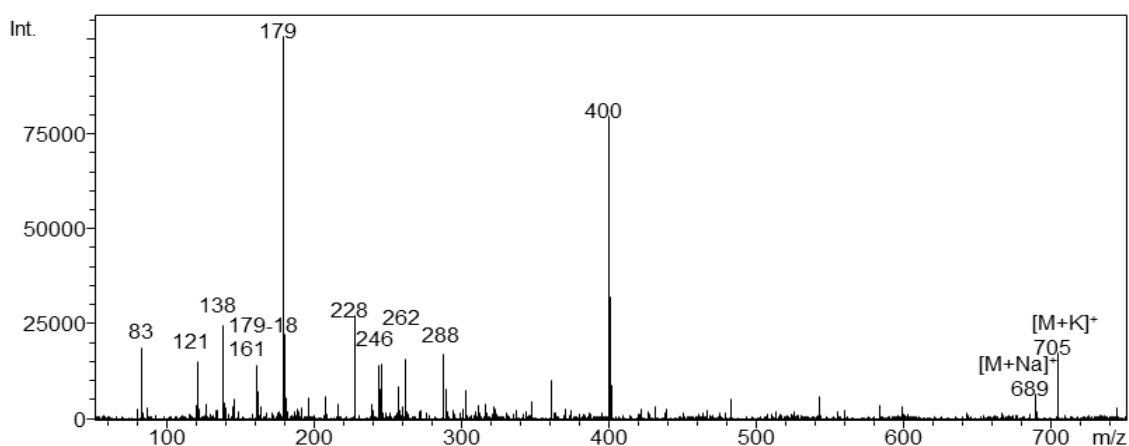


Abbildung 50: Nachweis von Stachyose (96) im HPLC/ESI-MS der Fraktion F0/6 bei einer Retentionszeit von $t = 5,51$ min

Bei einer HPLC-Retentionszeit von $t = 5,62$ min konnte Verbascose (97) (Abbildung 51) detektiert werden, die im ESI-MS das Kaliumaddukt $[M+K]^+$ mit m/z 867 aufwies (Abbildung 52). Es wurden außerdem die Fragmentationen mit m/z 179 und 543 ($[M+K-2Hex]^+$) detektiert. Das HR-ESI-FT-ICR-MS lieferte eine Masse von m/z 867,23865 $[M+K]^+$ (berechnet für $[C_{30}H_{52}O_{26}K]^+$: 867,23784).

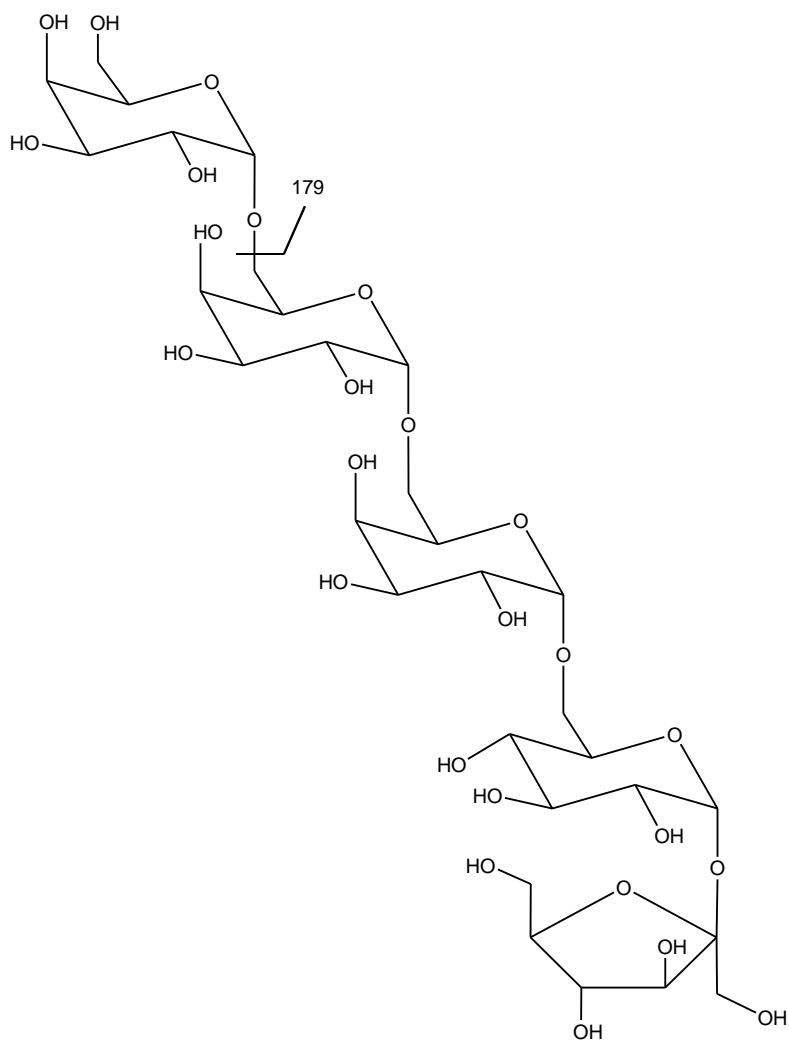


Abbildung 51: Struktur von Verbascose (97, M = 828) mit MS Fragment 179

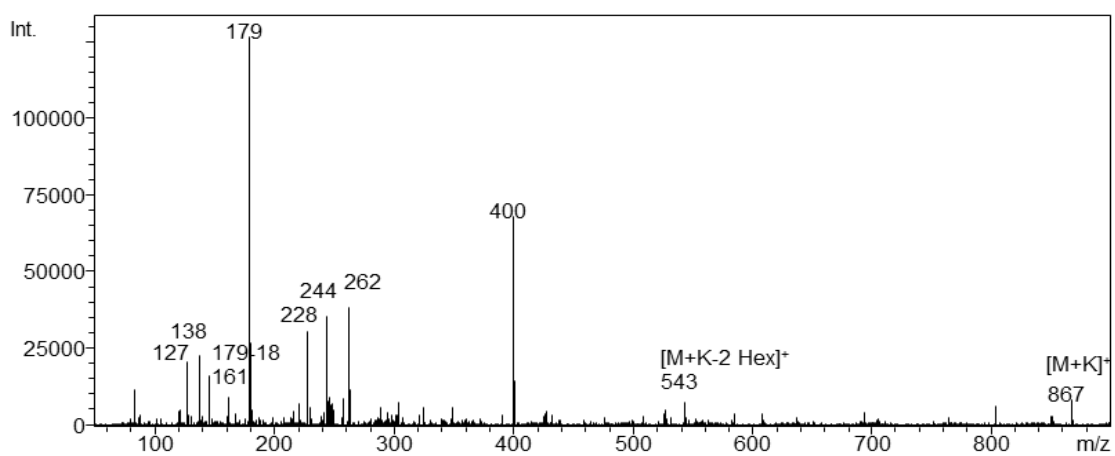


Abbildung 52: Nachweis von Verbascose (97) im HPLC/ESI-MS der Fraktion F0/6 bei einer Retentionszeit von $t = 5,62$ min

Bei einer Retentionszeit von $t = 6,36$ min eluierte außerdem eine Verbindung mit m/z 1013 ($[M+Na]^+$). Aufgrund von HPLC/ESI-MS Daten könnte es sich um Ajugose handeln ($M = 990$), die sich von Verbascose (**97**) durch eine zusätzliche α -D-Galaktopyranose in Position 6 der endständigen Galaktose von **97** unterscheidet.

Saccharose (**94**) ist in Pflanzen weit verbreitet. Raffinose (**95**), Stachyose (**96**) und Verbascose (**97**) kommen in der Natur vor allem im Samen von Hülsenfrüchten vor [63, 64]. Da *Spodoptera littoralis* - Larven mit einer künstlichen Diät aus Weißen Bohnen gefüttert wurden (siehe Abschnitt 5.3.1), wurden diese Oligosaccharide direkt mit der Nahrung aufgenommen und fanden sich im Regurgitat wieder.

3.2 Untersuchung des Duftstoffspektrums von Rainfarn

Das Duftstoffspektrum des Rainfarns umfasst 44 Monoterpene, 14 Sesquiterpene und 9 weitere Verbindungen. Diese sind bereits von P. Gros aus unserer Gruppe durch GC-MS charakterisiert worden [24, 25].

Die emittierten Duftstoffe wurden mittels CLSA-Technik gesammelt und durch GC qualitativ und quantitativ analysiert. Anhand der GC-Retentionszeiten und der daraus errechneten Kovats-Indices konnten sie identifiziert werden. Aus den dazugehörigen Peakflächen wurden die Substanzmengen bestimmt. Die Strukturen der Duftstoffe aus Rainfarn, ihre Kovats-Indices und Massenspektren sind im Kapitel 6 wiedergegeben.

3.2.1 Monoterpene

Die Monoterpene, die als Duftstoffe des Rainfarns nach Raupenfraß von *Spodoptera littoralis* nachgewiesen werden konnten, werden in sehr unterschiedlichen Konzentrationen abgegeben. Es wurde ein charakteristisches Duftstoffbukett beobachtet, in dem die in Abbildung 53 aufgeführten Monoterpene in signifikant erhöhten Konzentrationen vorhanden sind [24, 25]. Um zu untersuchen, ob die aus dem Regurgitat gewonnene Fraktion F0 und ihre HPLC-Unterfraktionen Elicitoren enthalten, wurden Rainfarnpflanzen mit diesen Fraktionen behandelt (siehe Abschnitt 3.1) und die Konzentrationen der abgegebenen Duftstoffe untersucht.

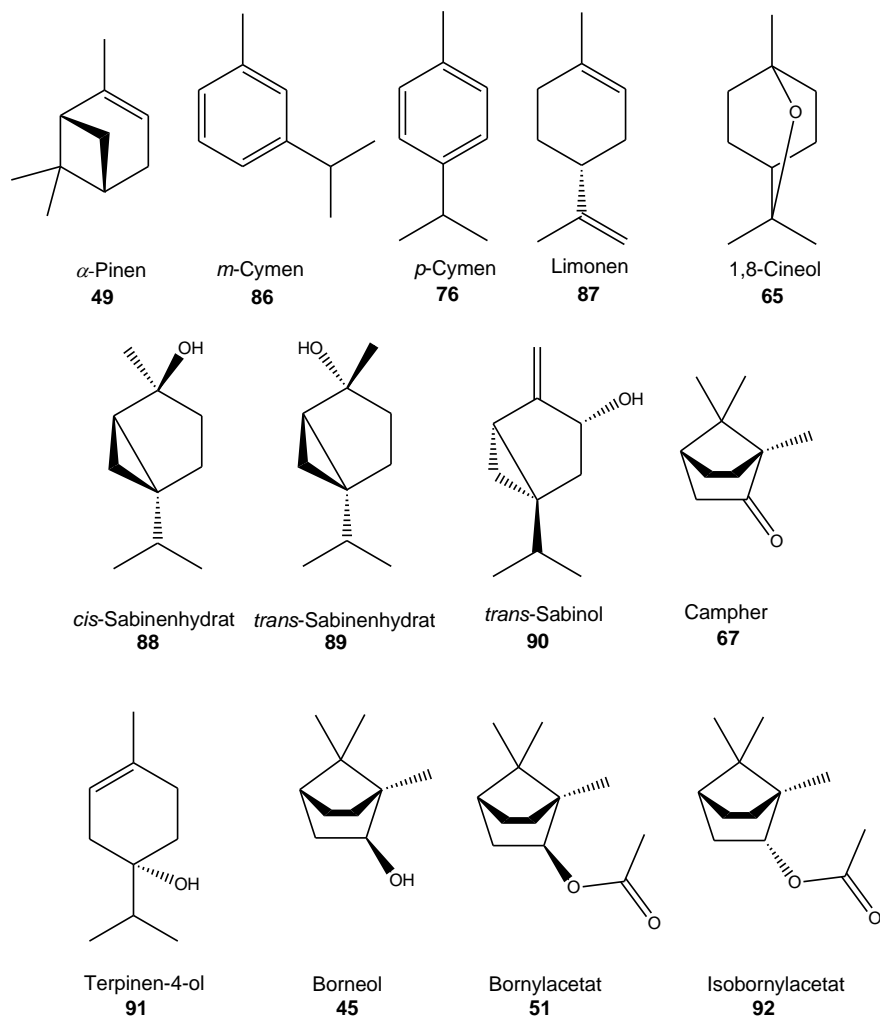


Abbildung 53: Strukturen der Monoterpene, die nach Fraß von *Spodoptera littoralis* – Larven an Rainfarn von diesem abgegeben werden

3.2.1.1 Monoterpen-Elicitoraktivitäten von Fraktion F0 und ihren HPLC-Unterfraktionen

α -Pinen (49) wird von allen HPLC-Fraktionen von F0 in gewissem Maße eliciert, jedoch besonders stark von den Fraktionen F0/4 und F0/6 (Abbildung 54). Eine geringfügige Elicitierung durch alle Fraktionen könnte ein Effekt des pH-Wertes sein. Die Regurgitatfraktion F0 hat einen pH von etwa 9,5 und es wurde bereits gezeigt [24, 25], dass basische Lösungen die Emission von Monoterpenen in gewissem Maße auslösen können.

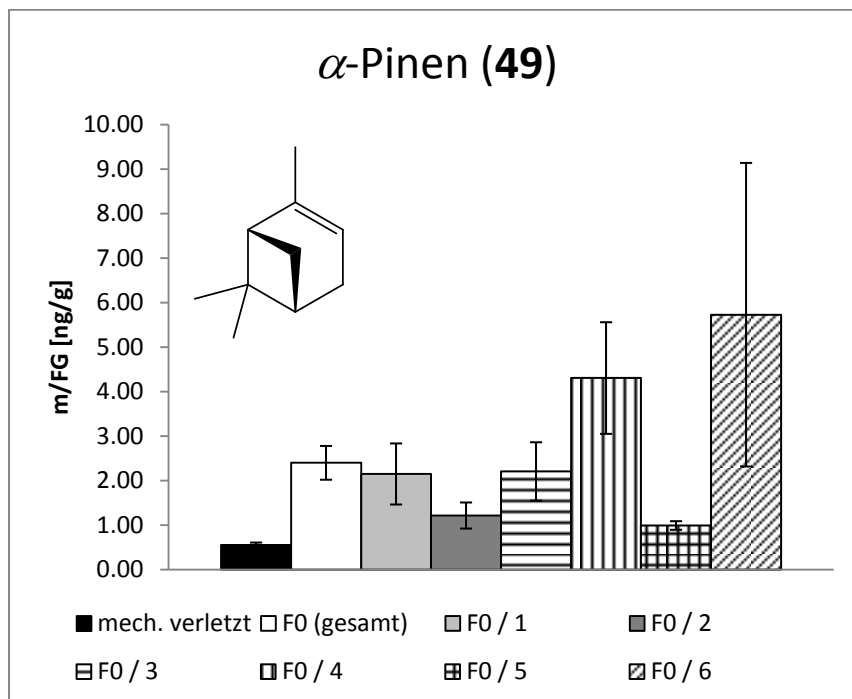


Abbildung 54: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für α -Pinen (49) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Da die Duftstoffe *m*- und *p*-Cymen (86, 76) im GC nicht trennbar waren, wurde die Gesamtkonzentration ermittelt. Sie werden ausschließlich durch die Fraktion F0/6 elicitiert (Abbildung 55).

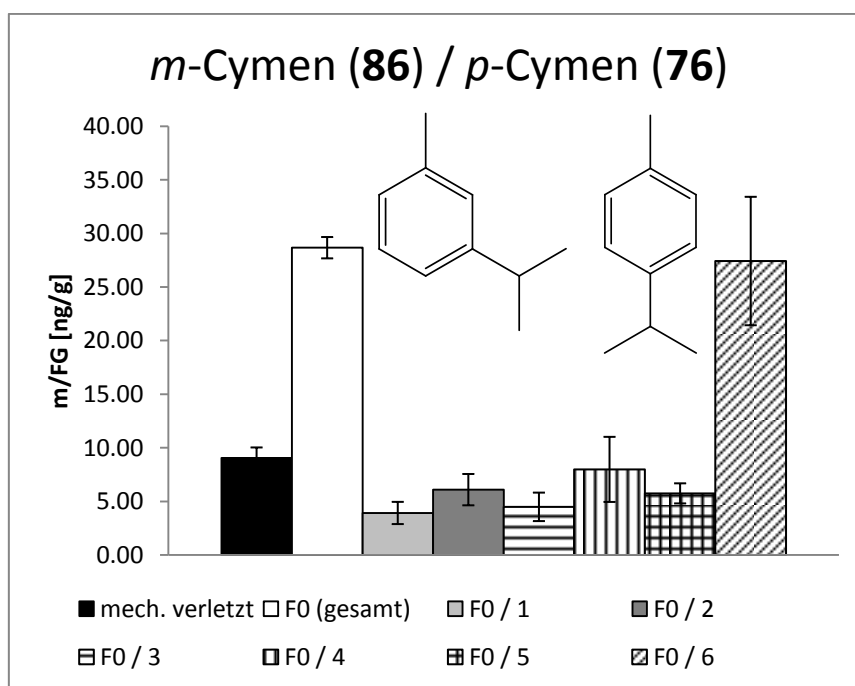


Abbildung 55: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *m*-Cymen (86) / *p*-Cymen (76) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Die Duftstoffe Limonen (**87**) und 1,8-Cineol (**65**) waren im GC ebenfalls nicht trennbar. Deshalb wurde ihre Gesamtkonzentration ermittelt. Sie werden durch die Fraktion F0/6 elicitiert (Abbildung 56).

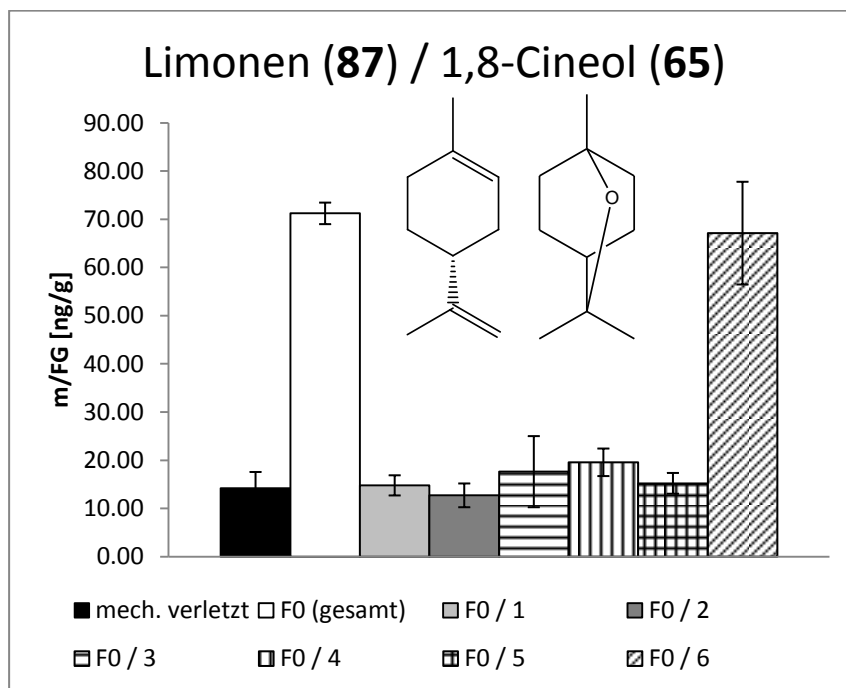


Abbildung 56: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Limonen (**87**) / 1,8-Cineol (**65**) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

cis-Sabinenhydrat (**88**) (Abbildung 57) und *trans*-Sabinenhydrat (**89**) (Abbildung 58) werden auch durch die Fraktion F0/6 elicitiert. Die Duftstoffe *trans*-Sabinol (**90**) und Campher (**67**), die bei identischer Retentionszeit im GC eluieren, werden besonders von den HPLC-Fractionen F0/4 und F0/6 elicitiert (Abbildung 59). Es kann nicht signifikant belegt werden, ob die übrigen Fraktionen, die sehr geringe Aktivitäten aufweisen, ebenfalls für *trans*-Sabinol und Campher elicitierend wirken.

Terpinen-4-ol (**91**) wird durch die HPLC-Fraktion F0/2 elicitiert (Abbildung 60). Später wird gezeigt, dass die in der Fraktion F0/6 enthaltenen Oligosaccharide Raffinose und Stachyose leichte Elicitierungsaktivitäten für Terpinen-4-ol zeigen (vergleiche Abschnitt 3.2.1.2).

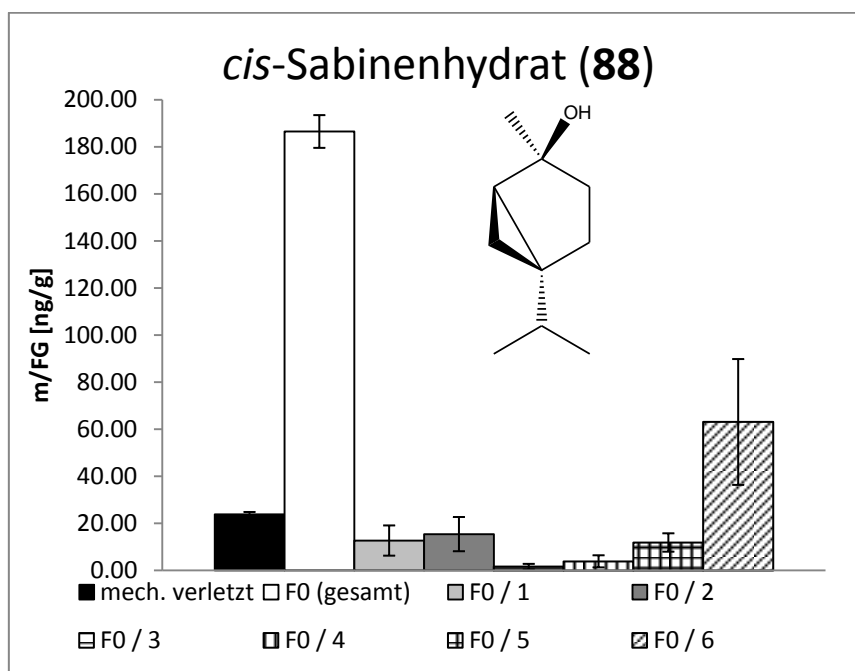


Abbildung 57: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *cis*-Sabinenhydrat (88) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

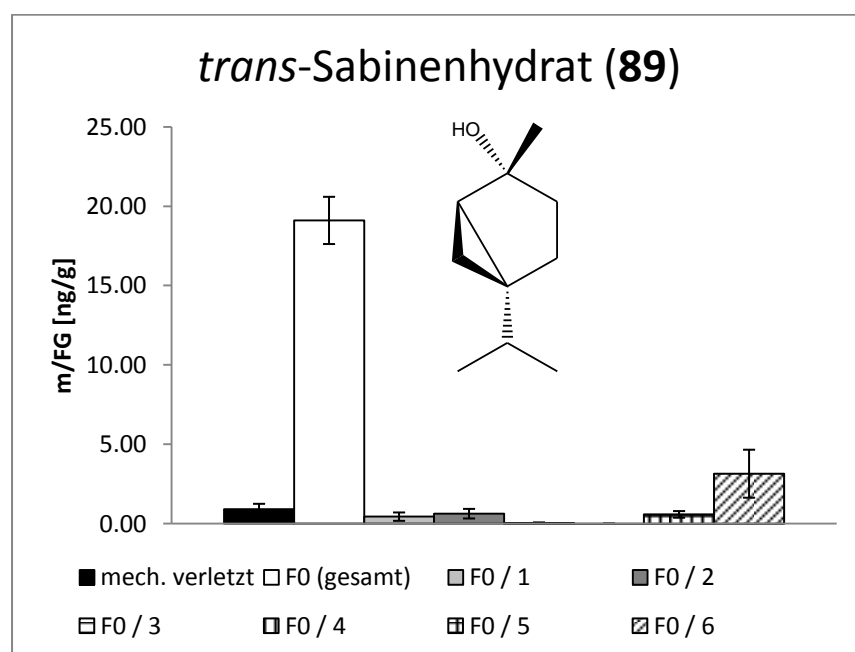


Abbildung 58: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *trans*-Sabinenhydrat (89) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

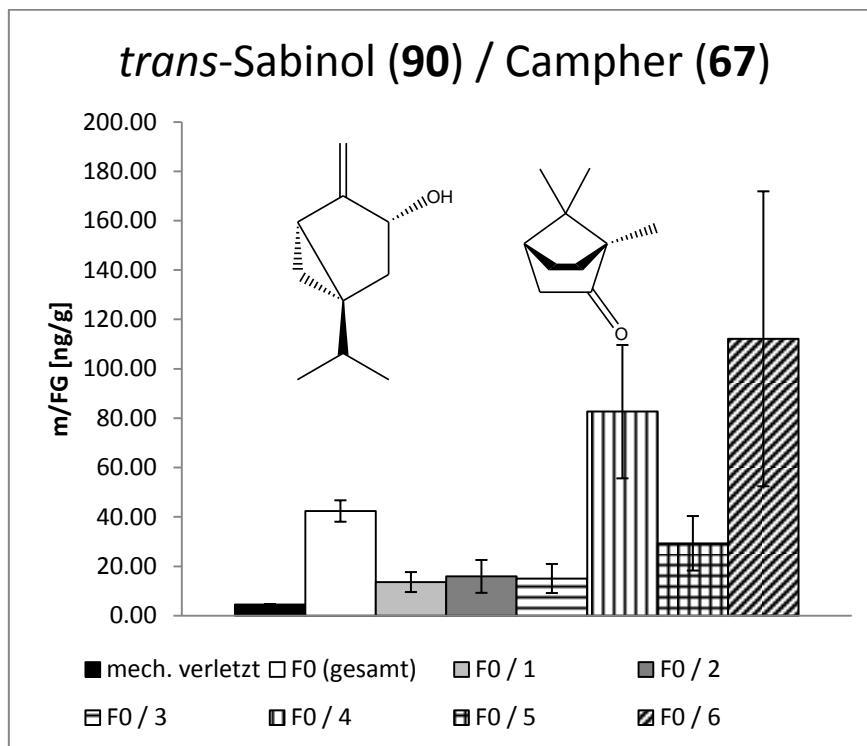


Abbildung 59: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfar-Duftstoffkonzentrationen für *trans*-Sabinol (90) / Campher (67) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

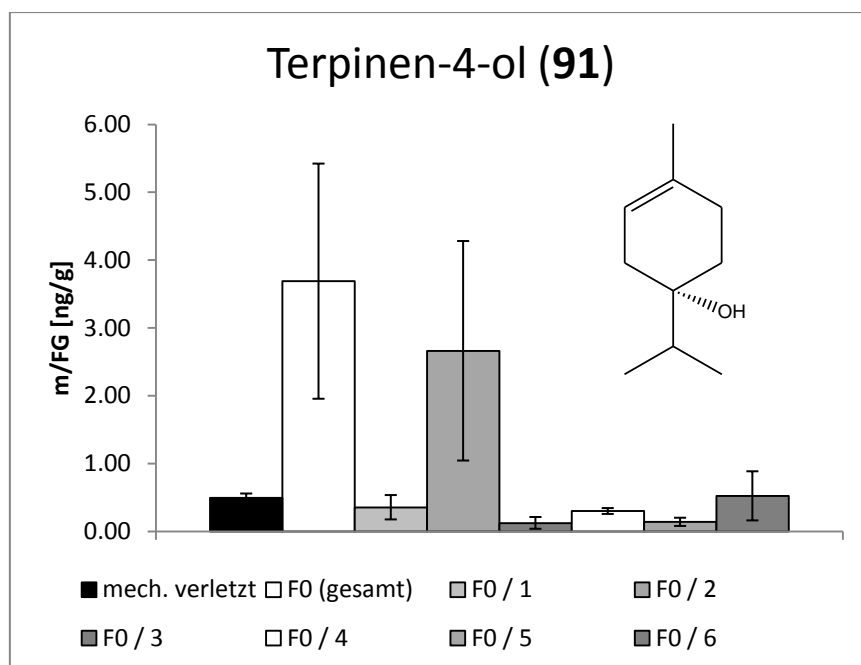


Abbildung 60: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfar-Duftstoffkonzentrationen für Terpinen-4-ol (91) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Borneol (45) wird von Elicitoren in den Fraktionen F0/4 bis F0/6 eliciert, wobei F0/6 die höchste Aktivität hat (Abbildung 61).

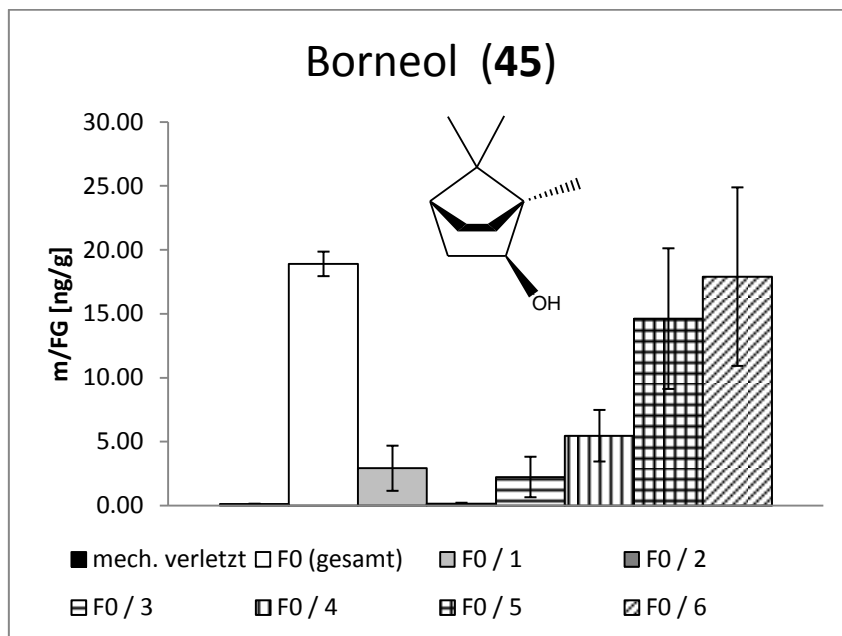


Abbildung 61: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Borneol (45) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Die Monoterpene Bornylacetat (51) und Isobornylacetat (92), die im GC gleichzeitig detektiert und daher als Summe erfasst werden, können von den Fraktionen F0/4, F0/5 und F0/6 elicitiert werden. Die höchste Aktivität hat hier die Fraktion F0/4 (Abbildung 62).

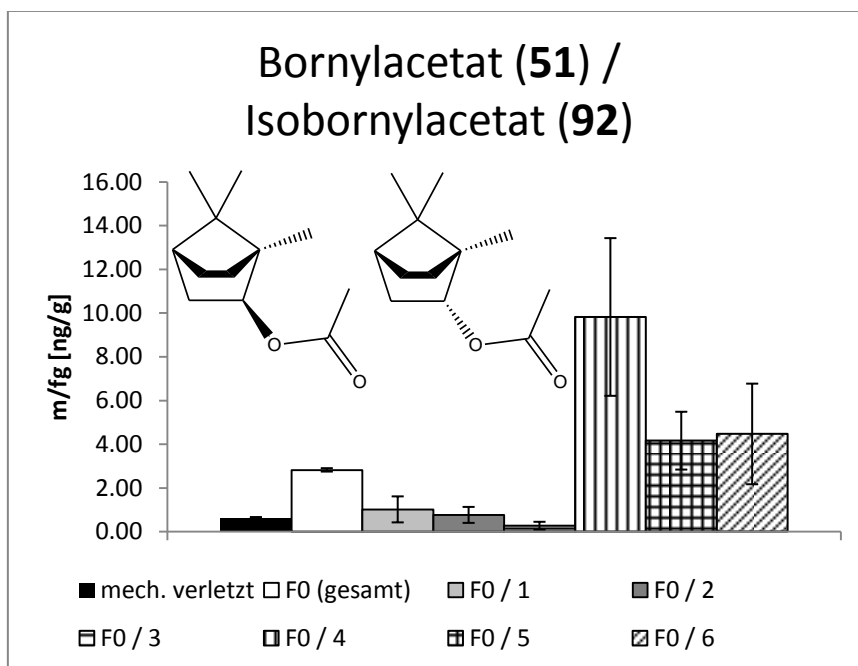


Abbildung 62: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Bornylacetat (51) / Isobornylacetat (92) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Die HPLC-Fraktion F0/6 hat eine starke Elicitierungsaktivität für die Monoterpene α -Pinen, *m*-Cymen / *p*-Cymen, *cis*-Sabinenhydrat, *trans*-Sabinenhydrat, Limonen / 1,8-Cineol, *trans*-Sabinol / Campher, sowie Borneol und Bornylacetat / Isobornylacetat. Die HPLC-Fraktion F0/4 eliciert α -Pinen, *trans*-Sabinol und Campher, sowie Borneol. Außerdem wird α -Pinen in geringem Maße von allen anderen HPLC-Fraktionen von F0 eliciert. Durch die HPLC-Fraktion F0/2 wird Terpinen-4-ol eliciert.

Für die genannten Rainfarnduftstoffe wurde in Studien von P. Gros [24, 25] eine charakteristische Steigerung der Emission bei Fraß von *Spodoptera littoralis* - Raupen an Rainfarnpflanzen festgestellt. Daher konnte man erwarten, dass diese Duftstoffe durch Applikation bestimmter Fraktionen aus dem Regurgitat von *Spodoptera littoralis* spezifisch eliciert werden.

3.2.1.2 Monoterpen-Elicitoraktivitäten von Oligosacchariden

Aufgrund der Ergebnisse der NMR- und massenspektroskopischen Untersuchungen (siehe 3.1.2), die Saccharose (**94**), Raffinose (**95**), Stachyose (**96**) und Verbascose (**97**) in der Fraktion F0/6 nachwiesen, wurden diese kommerziell erhältlichen Oligosaccharide in analoger Weise wie die Regurgitatfraktionen an Rainfarnpflanzen appliziert, die Rainfarnduftstoffe mit Hilfe der CLSA gesammelt und durch GC qualitativ und quantitativ analysiert. Auf diese Weise sollte ihre Elicitoraktivität überprüft werden.

Die Duftstoffabgabe von α -Pinen (**49**) wird von Raffinose, Stachyose und Verbascose eliciert. Von diesen Elicitoren ist Stachyose der aktivste (Abbildung 63).

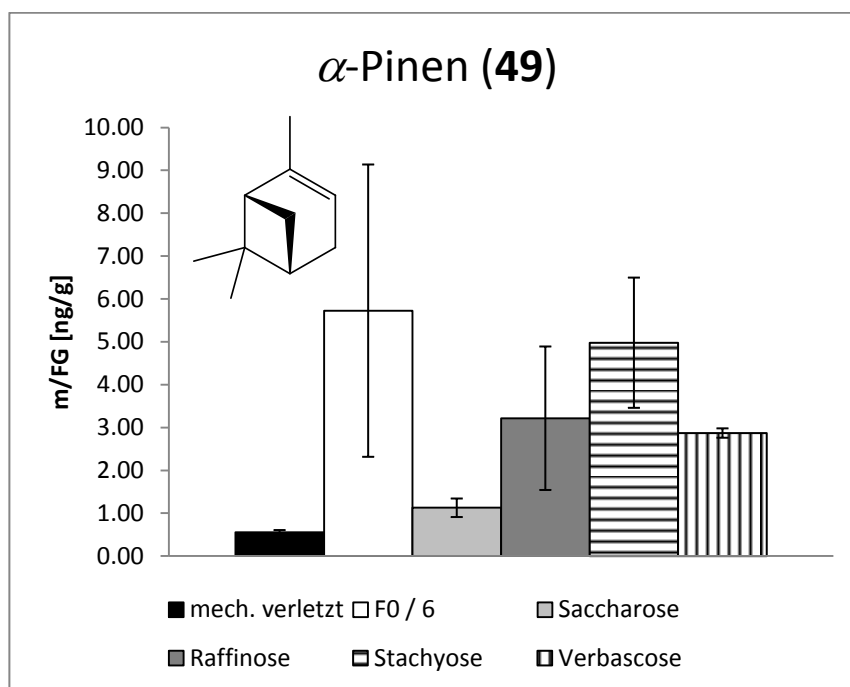


Abbildung 63: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für α -Pinen (49) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Die Monoterpene *m*-Cymen (86) und *p*-Cymen (76) werden von Raffinose etwas und von Verbascose stark elicitiert (Abbildung 64).

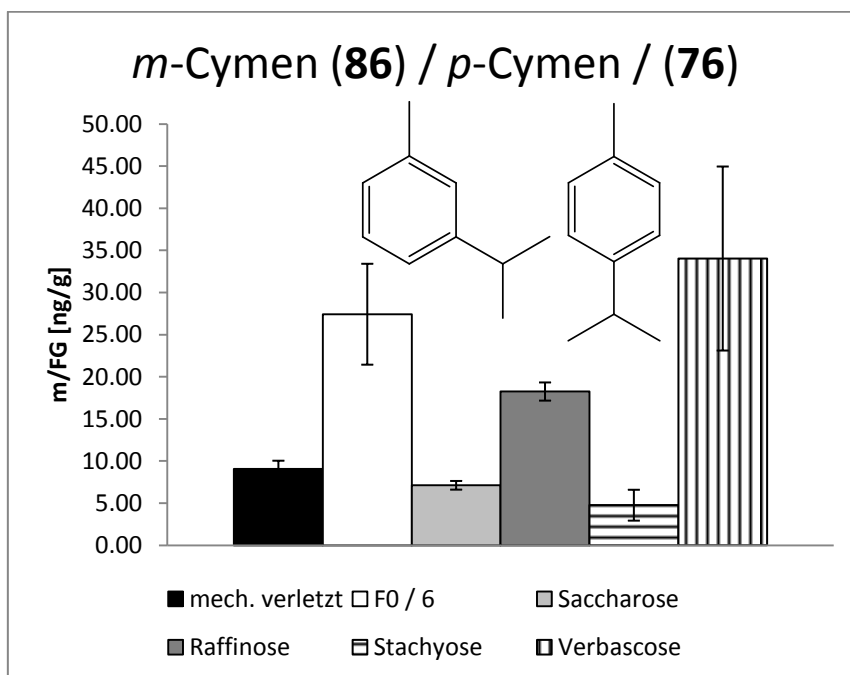


Abbildung 64: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *m*-Cymen (86) / *p*-Cymen (76) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Die Monoterpene Limonen (**87**) und 1,8-Cineol (**65**) werden von allen vier Oligosacchariden eliciert, auch von Saccharose (Abbildung 65).

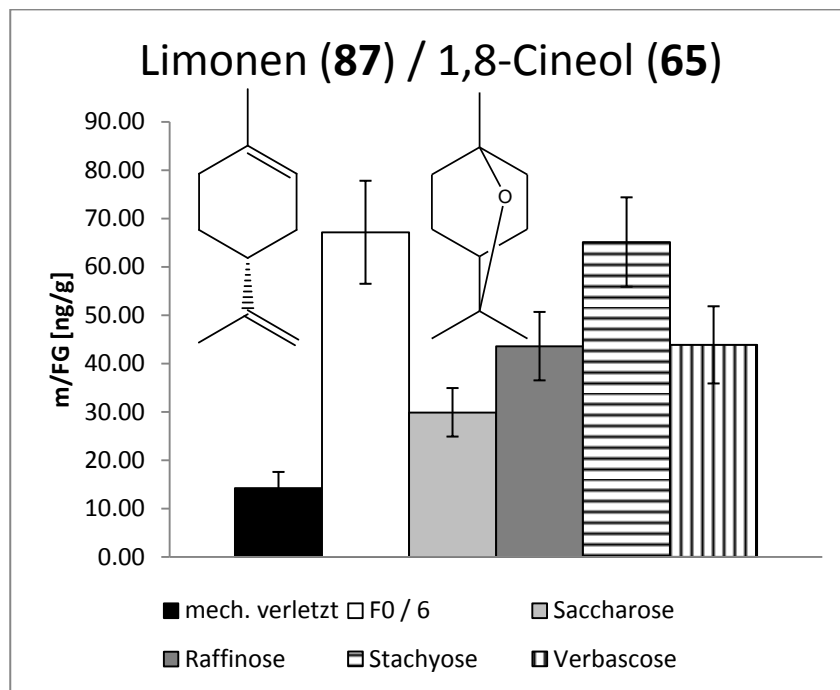


Abbildung 65: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Limonen (**87**)/ 1,8-Cineol (**65**) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

cis-Sabinenhydrat (**88**) wird von Stachyose eliciert. Auch Saccharose stimuliert die Emission von *cis*-Sabinenhydrat (Abbildung 66).

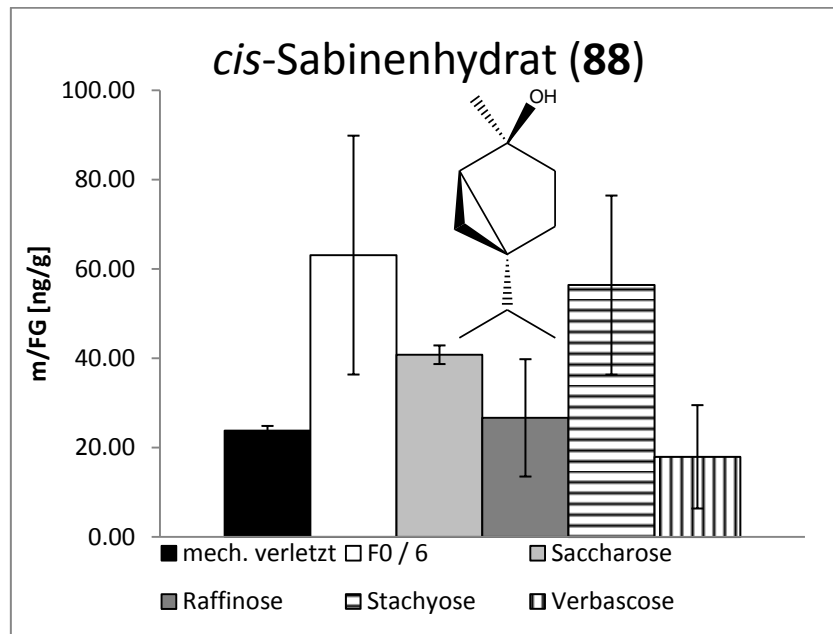


Abbildung 66: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *cis*-Sabinenhydrat (88) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Lösungen von Raffinose und von Stachyose elicieren *trans*-Sabinenhydrat (89). *trans*-Sabinenhydrat wird auch bei Applikation von Saccharose-Lösung in leicht erhöhter Konzentration abgegeben (Abbildung 67).

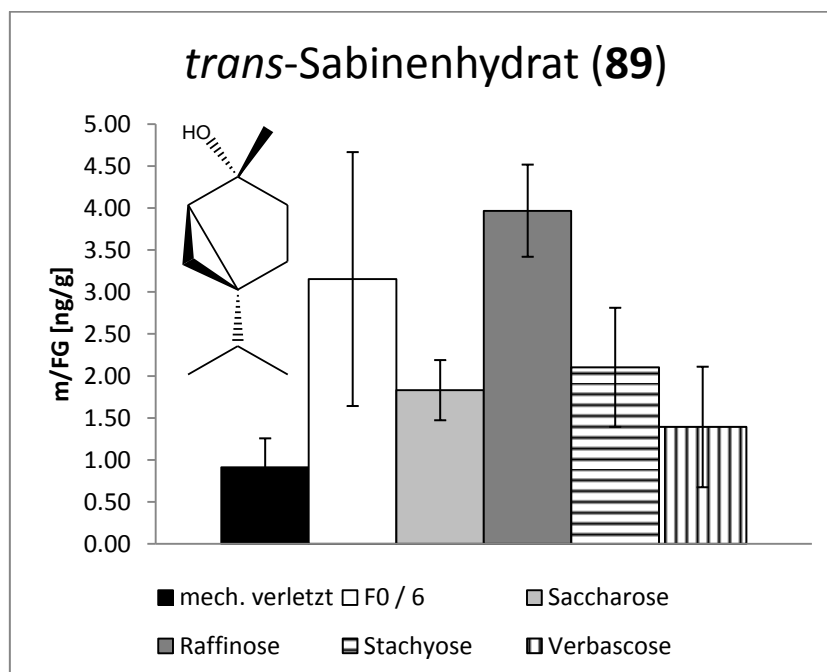


Abbildung 67: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *trans*-Sabinenhydrat (89) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Die Monoterpene *trans*-Sabinol (**90**) und Campher (**67**) werden bei Einwirkung von jedem der 4 Oligosaccharide in deutlich erhöhter Konzentration abgegeben (Abbildung 68).

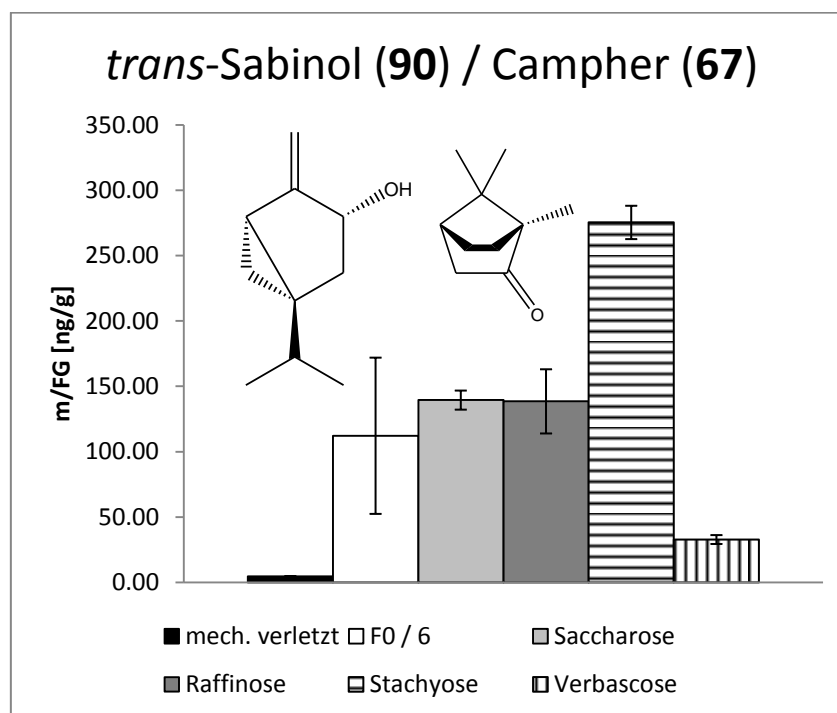


Abbildung 68: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *trans*-Sabinol (**90**) / Campher (**67**) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Stachyose und Verbascode elicitieren die Duftstoffabgabe von Borneol (**45**) (Abbildung 69). Raffinose und Stachyose elicitieren die Duftstoffabgabe von Terpinen-4-ol (**91**) (Abbildung 70).

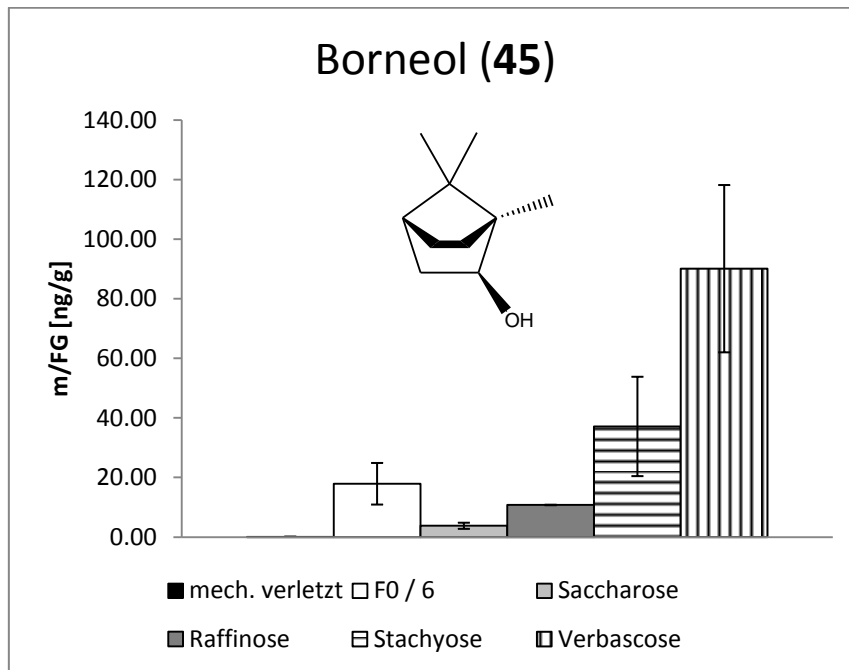


Abbildung 69: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Borneol (45) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

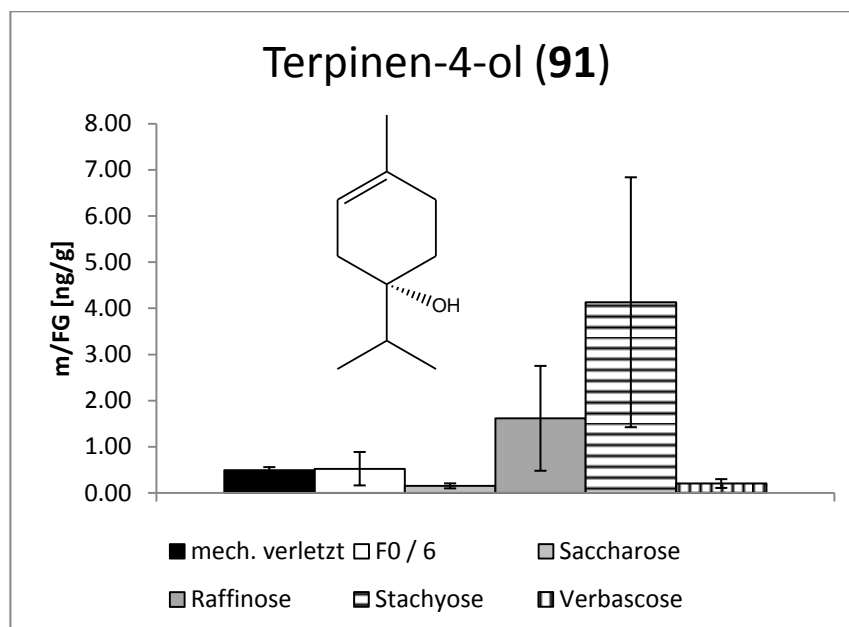


Abbildung 70: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Terpinen-4-ol (91) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Stachyose eliciert sowohl die Duftstoffabgabe von Borneol (45) (Abbildung 69) als auch von Bornylacetat (51) und Isobornylacetat (92) (Abbildung 71).

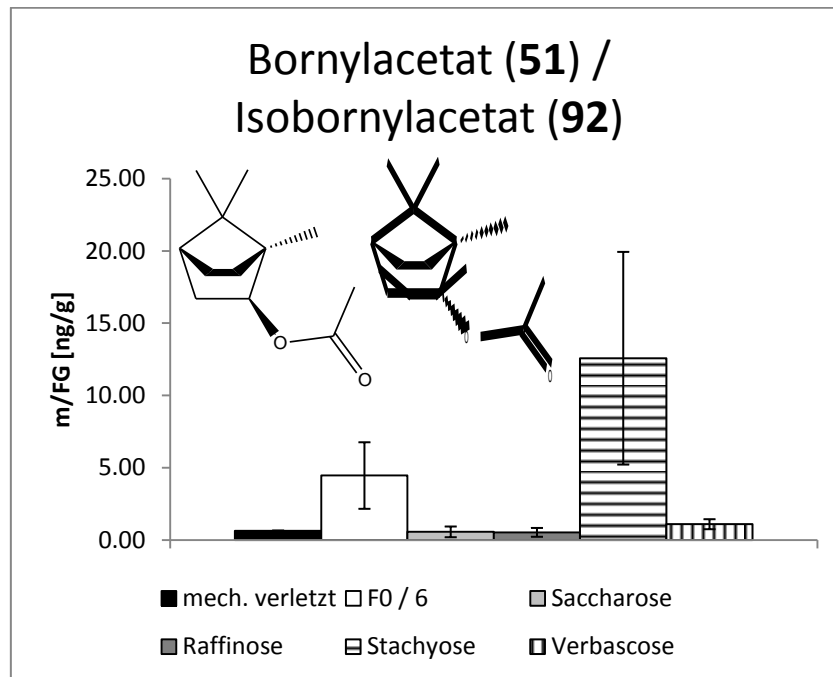


Abbildung 71: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Bornylacetat (51)/ Isobornylacetat (92) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

3.2.2 Sesquiterpene

3.2.2.1 Sesquiterpen-Elicitoraktivitäten von Fraktion F0 und ihren HPLC-Unterfraktionen

Bei Raupenfraß von *Spodoptera littoralis* an Rainfarnpflanzen werden ähnlich wie bei den Monoterpenen nur wenige Sesquiterpene wie *trans*- β -Caryophyllen (62), Germacren D (53) und Bicyclogermacren (92) als Duftstoffe in deutlich erhöhten Konzentrationen abgegeben (Abbildung 72). Diese sollten auch nach Applikation von Fraktion F0 und ihren HPLC-Unterfraktionen an Rainfarnpflanzen elicitiert werden.

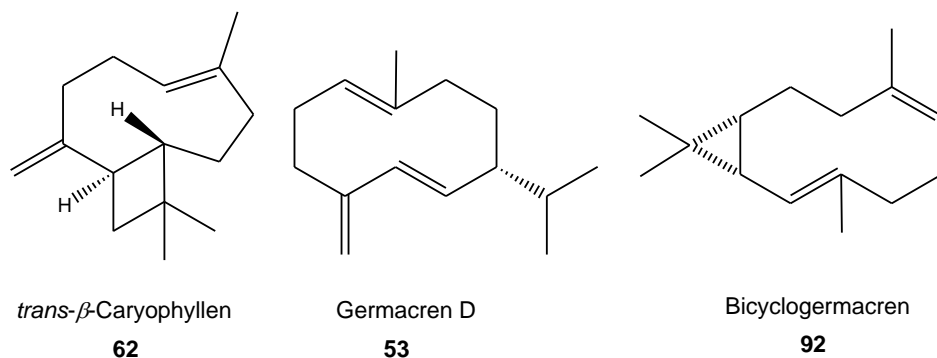


Abbildung 72: Strukturen der durch die Regurgitat-Fraktion F0 von *Spodoptera littoralis* bei Rainfarn elicitierten Sesquiterpene

Die Duftstoffabgabe von *trans*-β-Caryophyllen (**62**) wird von Fraktion F0/4 elicitiert (Abbildung 73).

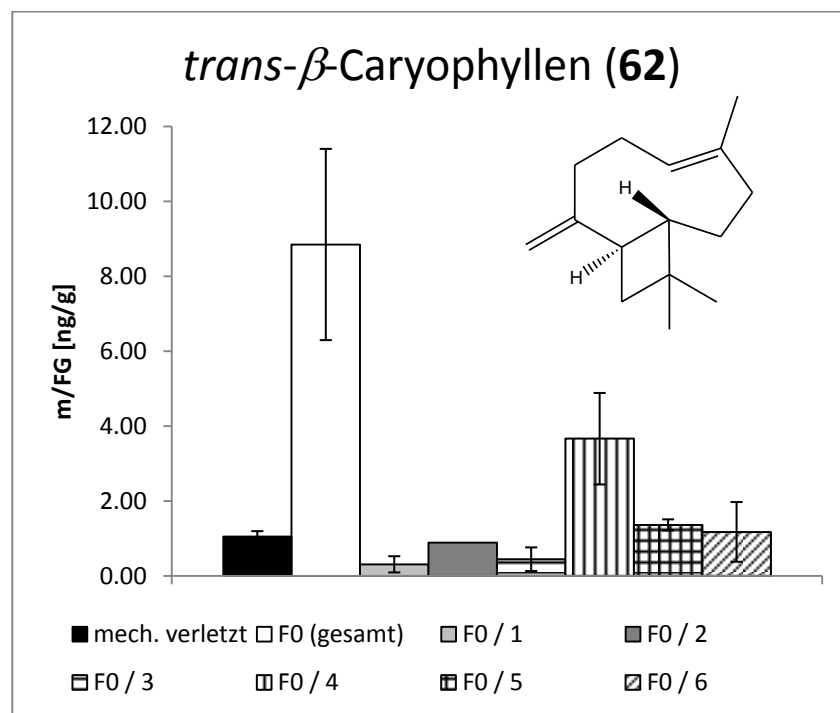


Abbildung 73: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für *trans*-β-Caryophyllen (**62**) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Mit der Fraktion F0/6 konnten Germacren D (**53**) und Bicyclogermacren (**92**) elicitiert werden (Abbildung 74, Abbildung 75).

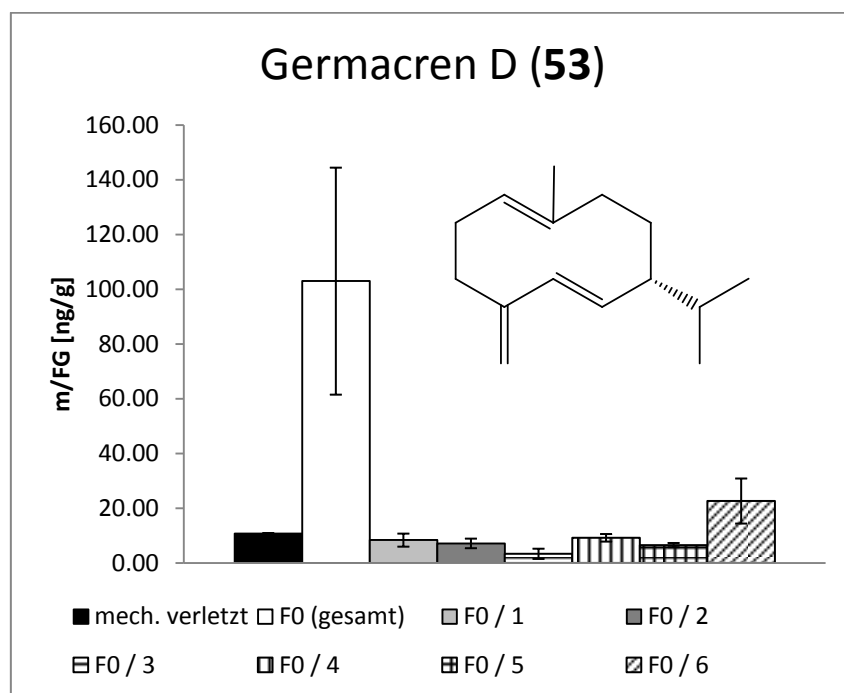


Abbildung 74: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Germacren D (53) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

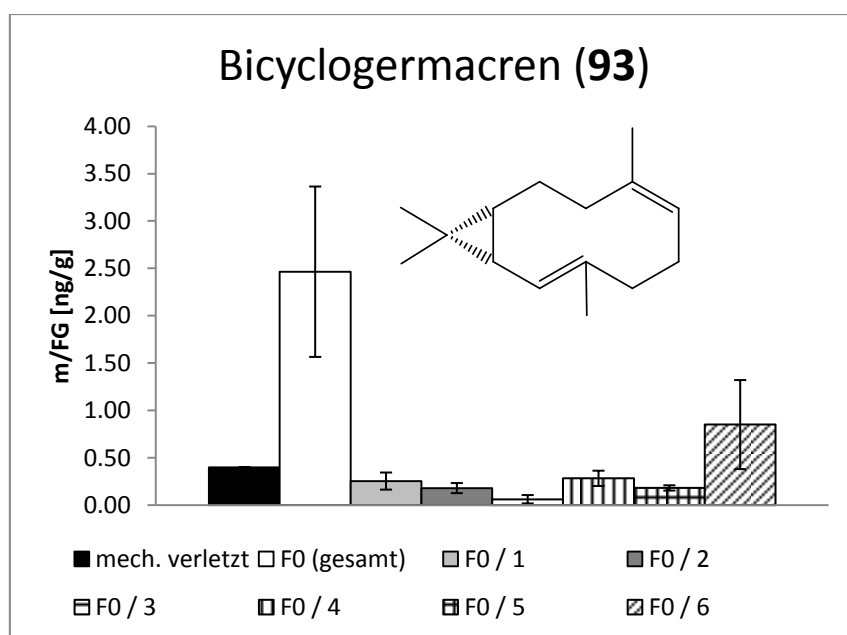


Abbildung 75: Elicitoraktivitäten der Fraktionen F0 und F0/1 – F0/6 – Rainfarn-Duftstoffkonzentrationen für Bicyclogermacren (93) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von Aliquots der Fraktionen)

Alle anderen Fraktionen zeigten keine Elicitoraktivität für Sesquiterpene.

3.2.2.2 Sesquiterpen-Elicitoraktivitäten von Oligosacchariden

Mit den kommerziell erhältlichen Standards der Oligosaccharide Saccharose (**94**), Raffinose (**95**), Stachyose (**96**) und Verbascose (**97**), die in der Fraktion F0/6 nachgewiesen wurden, wurde auch deren Elicitoraktivität für Sesquiterpene untersucht.

Die Duftstoffabgabe von *trans*- β -Caryophyllen (**62**) wird von keinem der genannten Oligosaccharide elicitiert (Abbildung 76). Das ist leicht erklärbar, weil die Applikation von Fraktion F0/4 und nicht F0/6 an Rainfarnpflanzen zur verstärkten Abgabe von *trans*- β -Caryophyllen führte.

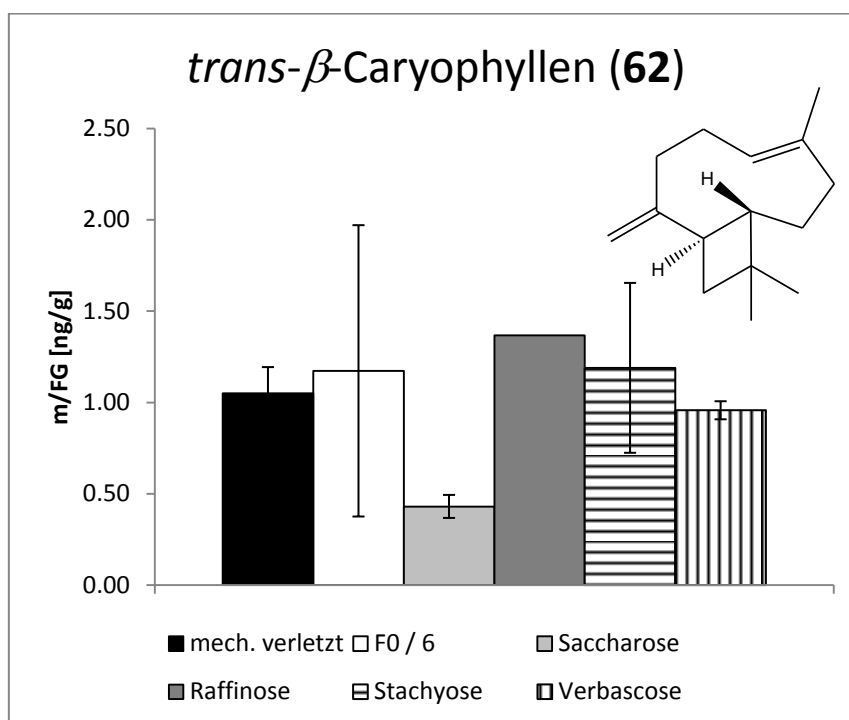


Abbildung 76: Elicitoraktivitäten von Fraktion F0/6 und Oligosacchariden – Vergleich der Duftstoffkonzentrationen für *trans*- β -Caryophyllen (**62**) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Germacren D (**53**) konnte zwar von der Fraktion F0/6 elicitiert werden, aber von keinem der 4 Oligosaccharide Saccharose, Raffinose, Stachyose oder Verbascose (Abbildung 77). Der Elicitor für dieses Sesquiterpen muss also eine andere Verbindung aus der Fraktion F0/6 sein. Anhand der HPLC/ESI-MS-Daten ($[M+Na]^+$ m/z 1013) ist zu vermuten, dass es sich bei diesem Elicitor um ein längerkettiges Oligosaccharid mit einem Molekulargewicht von $M = 990$ g/mol handelt.

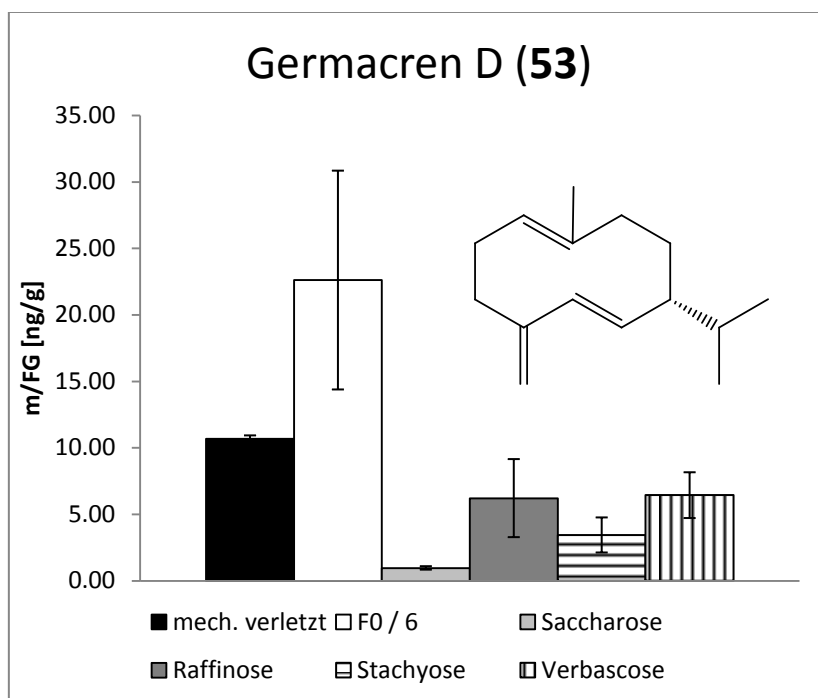


Abbildung 77: Elicitoraktivitäten von Oligosacchariden aus Fraktion F0/6 – Vergleich der Duftstoffkonzentrationen für Germacren D (53) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

Das Gleiche gilt auch für den Elicitor von Bicyclogermacren (93) (Abbildung 78).

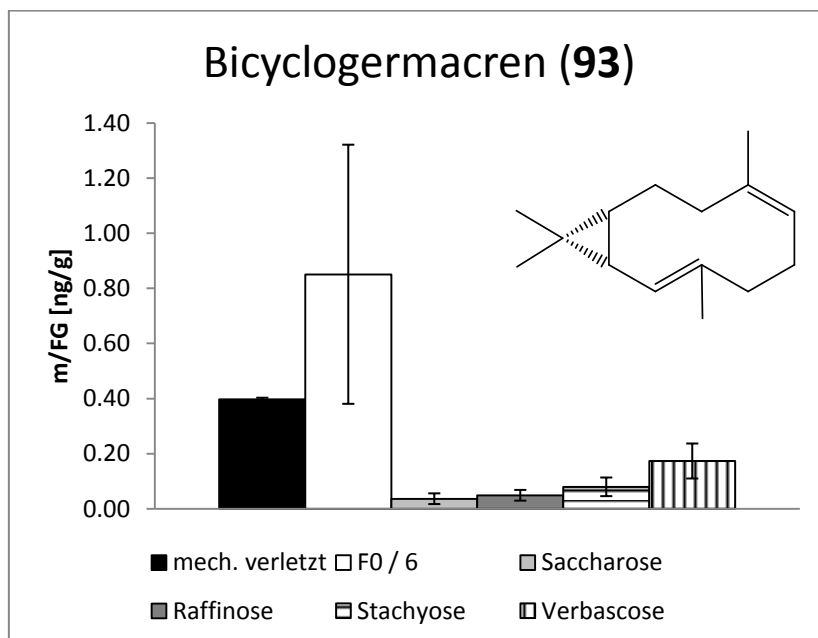


Abbildung 78: Elicitoraktivitäten von Oligosacchariden aus Fraktion F0/6 – Vergleich der Duftstoffkonzentrationen für Bicyclogermacren (93) nach mechanischer Verletzung (Kontrollpflanzen in Wasser) und Elicitierung (mechanisch verletzte Pflanzen in wässrigen Lösungen von einem Aliquot der Fraktion F0/6 und von definierten Mengen an Oligosacchariden)

3.3 Diskussion

Insgesamt konnten vier verschiedene HPLC-Fractionen F0/2, F0/4, F0/5 und F0/6 aus dem mit Wasser festphasenextrahierten proteinfreien Regurgitatextrakt F0 positiv auf Elicitoraktivität bei Rainfarn getestet werden (Tabelle 3, Tabelle 4).

Da diese HPLC-Fractionen unterschiedliche Polaritäten hatten, mussten zumindest 4 verschiedene Elicitoren aus dem Regurgitat von *Spodoptera littoralis* die Duftstoffemission des Rainfarns stimulieren. Diese elicitieren die Bildung unterschiedlicher Monoterpene und Sesquiterpene, induzieren also bestimmte Enzyme, die ihre Biosynthese bewirken.

Die Elicitoren aus den aktiven HPLC-Fractionen sollten isoliert und charakterisiert werden. Die Problematik lag in der zu geringen Trennleistung der RP18-Säule (Abbildung 39). Die Trennleistung wurde durch Wahl einer Diaminopropyl-modifizierten polaren Kieselgelphase, die speziell für die Trennung von Kohlenhydraten in wässrig-organischen Eluenten entwickelt wurde, und durch Optimierung des Laufmittels verbessert. Aufgrund der geringen Kapazität der analytischen Trennsäule und der trotz Verwendung der Diaminopropyl-modifizierten Kieselgelphase zu geringen Trennleistung (Abbildung 40), erschien es zunächst nicht mit vertretbarem Aufwand möglich zu sein, eine für die NMR-Spektroskopie ausreichende Substanzmenge zu gewinnen. Jedoch konnte die hohe Polarität der HPLC-Fraktion F0/6 ausgenutzt werden.

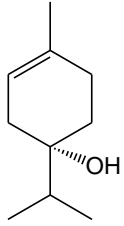
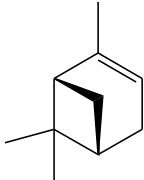
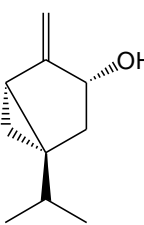
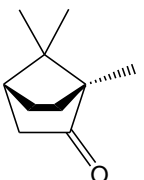
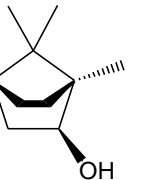
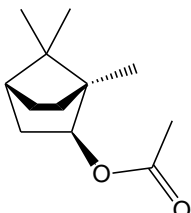
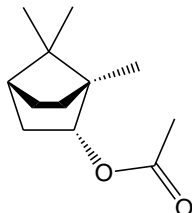
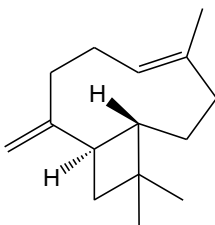
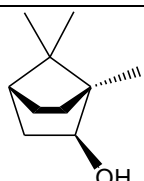
HPLC-Fraktion	Elicitierte Duftstoffe
F0 / 2	 Terpinen-4-ol
F0 / 4	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end;"> <div style="text-align: center;">  α-Pinen </div> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinol </div> <div style="text-align: center;">  Campher </div> <div style="text-align: center;">  Borneol </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  Bornylacetat </div> <div style="text-align: center;">  Isobornylacetat </div> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-β-Caryophyllen </div> </div>
F0 / 5	 Borneol

Tabelle 3: Elicitoraktivitäten der HPLC-Fraktionen F0/2, F0/4 und F0/5

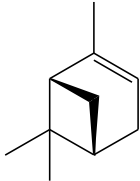
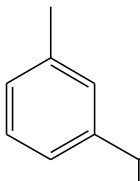
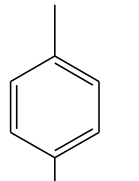
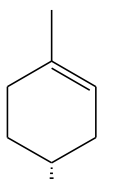
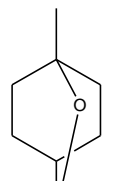
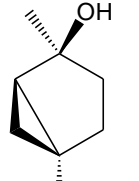
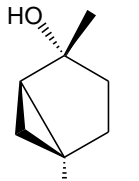
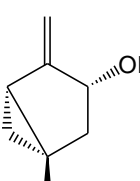
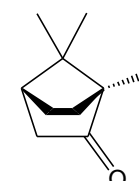
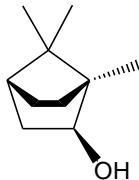
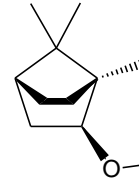
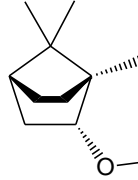
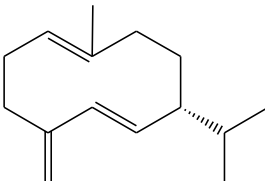
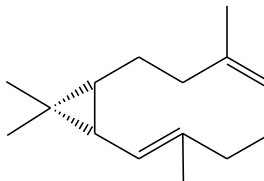
HPLC-Fraktion	Elicitierte Duftstoffe
F0/6	    
	<p><i>α</i>-Pinen <i>m</i>-Cymen <i>p</i>-Cymen Limonen 1,8-Cineol</p>    
	<p><i>cis</i>-Sabinenhydrat <i>trans</i>-Sabinenhydrat <i>trans</i>-Sabinol Campher</p>   
	<p>Borneol Bornylacetat Isobornylacetat</p>  
	<p>Germacren D Bicyclogermacren</p>

Tabelle 4: Elicitoraktivität der HPLC-Fraktion F0/6

Es wurde ein vereinfachtes Extraktionsverfahren angewendet, um von der polarsten aktiven HPLC-Fraktion F0/6 präparative Mengen erhalten zu können. So konnte eine NMR-Probe mit ca. 300 µg Substanz hergestellt werden, die auch durch HPLC/ESI-MS charakterisiert wurde.

Die Auswertung von 1D- und 2D-NMR-Spektren führte zur Struktur von Stachyose (**96**). Das ¹³C-Spektrum von Fraktion F0/6 zeigte weitere Signale im Bereich von Stachyose (**96**), so dass das Vorkommen von weiteren Oligosacchariden dieses Strukturtyps in F0/6 angenommen werden konnte.

Anhand der HPLC-Retentionszeiten, der ESI-Massenspektren und durch Vergleich mit authentischen Substanzen konnten in der Fraktion F0/6 die Oligosaccharide Saccharose (**94**), Raffinose (**95**), Stachyose (**96**) und Verbascose (**97**) eindeutig identifiziert werden.

Mit den kommerziell erhältlichen vier Oligosacchariden wurden Elicitierungsversuche an Rainfarn durchgeführt, um ihre Aktivität nachzuweisen. Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose elicitieren die Bildung einer Vielzahl unterschiedlicher Monoterpene, die in Tabelle 5 und in Tabelle 6 zusammengefasst sind.

Der Elicitor für die Sesquiterpene Germacren D (**53**) und Bicyclogermacren (**93**) konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Aufgrund der HPLC/ESI-MS Daten käme ein längerkettiges Oligosaccharid mit einem Molekulargewicht von $M = 990 \text{ g/mol}$ in Frage. Wahrscheinlich handelt es sich um Ajugose, die sich von Verbascose (**97**) durch eine zusätzliche α -D-Galaktopyranose in Position 6 der endständigen Galaktose von **97** unterscheidet. Leider war Ajugose nicht kommerziell erhältlich.

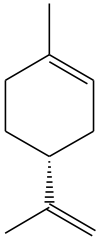
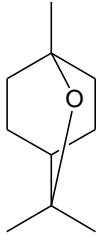

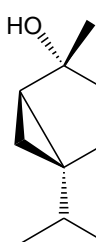
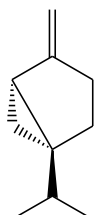

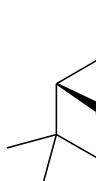
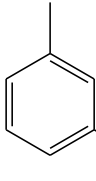
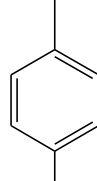
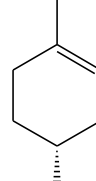
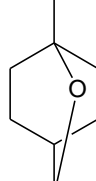
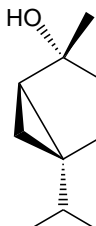
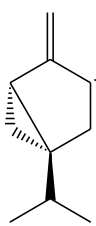

Elicitor	Elicitierte Duftstoffe
Saccharose	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  Limonen </div> <div style="text-align: center;">  1,8-Cineol </div> <div style="text-align: center;">  <i>cis</i>-Sabinenhydrat </div> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinenhydrat </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinol </div> <div style="text-align: center;">  Campher </div> </div>
Raffinose	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  α-Pinen </div> <div style="text-align: center;">  <i>m</i>-Cymen </div> <div style="text-align: center;">  <i>p</i>-Cymen </div> <div style="text-align: center;">  Limonen </div> <div style="text-align: center;">  1,8-Cineol </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinenhydrat </div> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinol </div> <div style="text-align: center;">  Campher </div> </div>

Tabelle 5: Saccharose und Raffinose als Elicitoren der Duftstoffemission bei Rainfarn

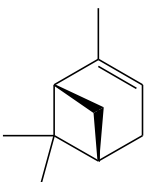
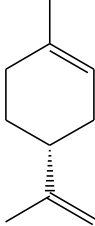
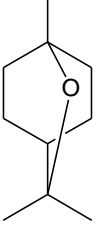


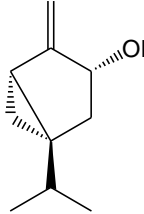
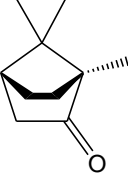
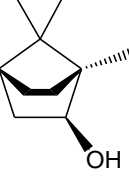
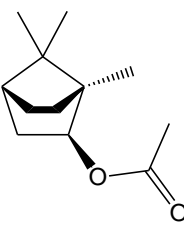
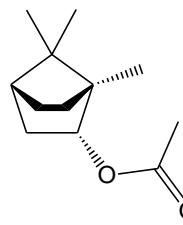
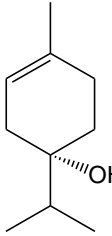
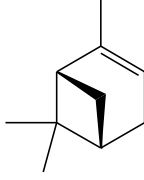
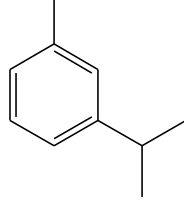
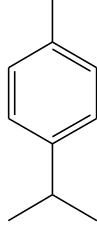
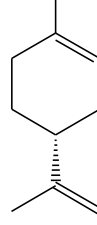
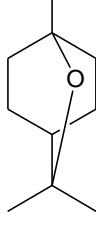
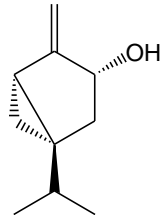
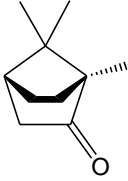
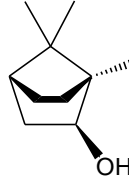
Elicitor	Elicitierte Duftstoffe
Stachyose	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  α-Pinen </div> <div style="text-align: center;">  Limonen </div> <div style="text-align: center;">  1,8-Cineol </div> <div style="text-align: center;">  <i>cis</i>-Sabinenhydrat </div> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinenhydrat </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinol </div> <div style="text-align: center;">  Campher </div> <div style="text-align: center;">  Borneol </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  Bornylacetat </div> <div style="text-align: center;">  Isobornylacetat </div> <div style="text-align: center;">  Terpinen-4-ol </div> </div>
Verbascose	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  α-Pinen </div> <div style="text-align: center;">  <i>m</i>-Cymen </div> <div style="text-align: center;">  <i>p</i>-Cymen </div> <div style="text-align: center;">  Limonen </div> <div style="text-align: center;">  1,8-Cineol </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <i>trans</i>-Sabinol </div> <div style="text-align: center;">  Campher </div> <div style="text-align: center;">  Borneol </div> </div>

Tabelle 6: Stachyose und Verbascose als Elicitor der Duftstoffemission bei Rainfarn

Insgesamt enthielt die Fraktion F0/6 fünf verschiedene Elicitoren der Duftstoffemission bei Rainfarn. Vier der Elicitoren konnten als die Oligosaccharide Saccharose (**94**), Raffinose (**95**), Stachyose (**96**) und Verbascose (**97**) identifiziert werden. Die Monoterpene Limonen (**87**) / 1,8-Cineol (**65**) und *trans*-Sabinol (**90**) / Campher (**67**) wurden durch alle vier Oligosaccharide eliciert. Außer in der Fraktion F0/6 wurde noch in den Fraktionen F0/2, F0/4 und F0/5 Elicitoraktivität nachgewiesen.

Bislang waren lediglich N-Acylglutaminkonjugate (z.B. Volicitin, **1**), sulfoxxygenierte Fettsäuren und ihre Glycinkonjugate (Caeliferine **9-12**), hydroxylierte Fettsäuren (Bruchine, **14-17**), Benzylcyanid, das Peptid Inceptin (**13**) und β -Glucosidasen als Elicitoren aus Herbivoren bekannt.

Mit Saccharose (**94**), Raffinose (**95**), Stachyose (**96**) und Verbascose (**97**) konnten zum ersten Mal vier Oligosaccharide, die aus dem Regurgitat des Herbivoren *Spodoptera littoralis* stammen, als Elicitoren der Duftstoffemission des Rainfarns nachgewiesen werden.

Als Elicitor für das fungizide Phytoalexin Glyceollin I (**19**) in *Glycine max* wirkt ein Hepta- β -D-glucosid (**18**) aus der Zellwand des Pilzes *Phytophthora sojae*, der ein Pathogen der Sojabohne ist. Vom Glucosid **18** weiß man [22], dass es die Phytoalexinsynthese über einen parakrinen rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweg induziert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Hepta- β -D-glucosids zu den in dieser Arbeit präsentierten Oligosacchariden **94-97** als Elicitoren aus *Spodoptera littoralis* könnte deren Elicitoraktivität ebenfalls auf einer parakrinen rezeptorvermittelten Signaltransduktion beruhen.

Das Ergebnis, dass die Rainfarn Duftstoffemission nach Applikation von Oligosacchariden aus dem Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen an verletzte Rainfarnpflanzen eliciert wird, ist in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von M. Leitner *et al.* [23]. Das Hepta- β -D-glucosid (**18**) aus *Phytophthora sojae* wurde an Pflanzen von *Medicago truncatula* appliziert und induzierte ein Duftstoffbukett, das vergleichbar war mit dem bei Fraß von *Spodoptera littoralis* Raupen an Pflanzen von *Medicago truncatula*.

Die im Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen detektierten Oligosaccharide Saccharose (94), Raffinose (95), Stachyose (96) und Verbascose (97) kommen in Weißen Bohnen vor [65]. Diese waren die Hauptkomponente in der Kunsthahrung für *Spodoptera littoralis* - Raupen. Somit wurden die Oligosaccharide mit der Nahrung aufgenommen. Das Verhältnis von Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose in Weißen Bohnen zur gesamten gelösten Zuckerfraktion ist 67,3, 63,2, 53,0 und 51 % [65]. Im Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen wurde bis auf Saccharose, deren Konzentration geringer war, ein ähnliches Konzentrationsverhältnis gefunden (vergleiche Abschnitt 3.1.2.2, Abbildung 43). Es wurden aber auch *Spodoptera littoralis* - Raupen auf frischen Rainfarnblättern gehalten. Wenn diese Raupen an Rainfarnblättern fraßen, wurde ein Duftstoffbukett von den Rainfarnpflanzen abgegeben, das sich nicht von dem unterschied, das nach Fraß von auf Kunsthahrung gehaltenen *Spodoptera littoralis* - Raupen an Rainfarn gefunden wurde. Rainfarnblätter enthalten wie alle höheren Pflanzen Saccharose, die von *Spodoptera littoralis* - Raupen beim Fressen aufgenommen wird. Möglicherweise wird im Vorderdarm der Raupen Saccharose in die anderen drei Oligosaccharide Raffinose, Stachyose und Verbascose umgewandelt.

Für die elicierten Monoterpene *p*-Cymen (76), 1,8-Cineol (65), Campher (67) und Limonen (87) wurde bereits zuvor eine Toxizität gegen *Spodoptera littoralis* - Larven bei Begasung nachgewiesen [3, 4] (siehe Abschnitt 2.3.2, Abbildung 29). Ob die Konzentrationen der in Rainfarn nach *Spodoptera littoralis* Raupenfraß gebildeten und abgegebenen vier Monoterpene ausreichend sind, um eine toxische Wirkung gegenüber *Spodoptera littoralis* - Raupen zu entfalten, müsste noch geklärt werden.

Ferner ist die fraßhemmende Wirkung von Sesquiterpenlactonen vom Germacrantyp auf *Spodoptera littoralis* - Larven bekannt [55] (siehe Abschnitt 2.3.2, Abbildung 31). Die Klärung der Frage, ob die bei Fraß von *Spodoptera littoralis* - Raupen verstärkt gebildeten Sesquiterpene Germacren D (53) und Bicyclogermacren (93) ebenfalls fraßhemmend wirken, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

4. Zusammenfassung

4.1 Deutsche Zusammenfassung

Beim Fraß von *Spodoptera exigua* - Raupen an Maispflanzen kommt es zur charakteristischen Abgabe von Terpenen, die Weibchen der parasitischen Wespe *Cotesia marginiventris* anlocken. Die Wespe legt in den *Spodoptera exigua* - Raupen ihre Eier ab, die sich zu Larven entwickeln und *Spodoptera exigua* - Raupen als Nahrungsquelle nutzen. Wenn *Spodoptera exigua* - Raupen an Maispflanzen fressen, gelangt der Elicitor Volicitin (1) aus dem Vorderdarmsekret in die Fraßwunde und löst die Bildung und Abgabe eines charakteristischen terpenoiden Duftstoffbuketts aus [9].

Volicitin (1) wurde auch im Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen nachgewiesen, induzierte aber keine Duftstoffemission bei Baumwoll- und Limabohnenpflanzen [16]. Bei Fraß von *Spodoptera littoralis* - Raupen an Limabohnenpflanzen wurde ein charakteristisches Duftstoffbukett abgegeben [17]. Es ergab sich die Frage, welche Elicitoren im Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen lösen die Duftstoffbildung in Limabohnen-, Baumwollpflanzen und vielen weiteren Pflanzen aus, die von *Spodoptera littoralis* - Raupen befallen werden.

Um dies zu untersuchen, hat P. Gros aus unserer Gruppe [24, 25] die Pflanzen – Herbivoresysteme Rainfarn – *Spodoptera littoralis* - Raupen und Rainfarn – *Autographa gamma* - Raupen ausgewählt. Sie hat herausgefunden, dass nach Fraß von *Spodoptera littoralis* - und *Autographa gamma* - Raupen an Rainfarn zwei charakteristische Duftstoffbuketts von Rainfarnpflanzen abgegeben werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Suche nach Elicitoren im Vorderdarmsekret (Regurgitat) von *Spodoptera littoralis* - Raupen für die Auslösung der Duftstoffproduktion in Rainfarnpflanzen.

Vier HPLC-Fractionen F0/2, F0/4, F0/5 und F0/6 der durch Festphasenextraktion aus dem Regurgitat von *Spodoptera littoralis* - Raupen erhaltenen Fraktion F0 induzieren nach Applikation an verletzte Rainfarnpflanzen die Emission von Mono- und Sesquiterpenen, die auch nach Fraß dieser Raupen an Rainfarn abgegeben werden.

Bei der Extraktion eines Aliquots der Fraktion F0 mit CH₃OH/H₂O 85:15 wurden 300 µg eines Rückstandes erhalten, der nach HPLC-Vergleich eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie die HPLC-Fraktion F0/6 aufwies.

Um Informationen über die Strukturen der in den Fraktionen enthaltenen Verbindungen zu erhalten, wurden NMR-Spektren von den Fraktionen F0 und F0/6 aufgenommen, die ¹H NMR Resonanzsignale in dem Bereich von $\delta = 3,20 - 5,40$ ppm zeigten, was auf Oligosaccharide hindeutete. Die Auswertung der 1D- und 2D-NMR Daten von Fraktion F0/6 führten zur Struktur von Stachyose (**96**). Weiterhin wurden im ¹³C-NMR Spektrum von F0/6 Signale mit chemischen Verschiebungen beobachtet, die im gleichen Bereich wie Stachyose lagen. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um Homologe von Stachyose wie Saccharose (**94**), Raffinose (**95**) und Verbascose (**97**) handeln könnte. Dieser Annahme wurde deshalb mit HPLC- und HPLC/ESI-MS Untersuchungen nachgegangen.

Durch Vergleich der HPLC-Retentionszeiten eines Standards aus den drei kommerziell erhältlichen Oligosacchariden Saccharose, Raffinose und Stachyose mit denen von Fraktion F0/6 konnten diese Saccharide identifiziert werden. Verbascose wurde durch Coinjektion von kommerziell erhältlicher Verbascose mit der Fraktion F0/6 detektiert. HPLC/ESI-MS des Saccharidgemisches von Fraktion F0/6 lieferte bei den entsprechenden Retentionszeiten die ESI-Massenspektren der vier Oligosaccharide. Hochaufgelöste ESI-Massenspektren von Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose aus der Fraktion F0/6 wurden an einem HR-ESI-FT-ICR-Massenspektrometer erhalten und sind in Übereinstimmung mit den Strukturen.

Die kommerziell erhältlichen Oligosaccharide Saccharose (94), Raffinose (95), Stachyose (96) und Verbascose (97) wurden in analoger Weise wie die Regurgitatfraktionen an verletzte Rainfarnpflanzen appliziert, das Rainfarnduftstoffspektrum mit der CSLA gesammelt und durch GC qualitativ und quantitativ analysiert.

Saccharose (94) erhöht wie die anderen drei Oligosaccharide die Emission von *trans*-Sabinol (90), Campher (67), Limonen (87) und 1,8-Cineol (65). Außerdem induziert sie die Bildung von *cis*- und *trans*-Sabinenhydrat (88, 89). Raffinose (95), Stachyose (96) und Verbascose (97) elicitieren zusätzlich zu den schon aufgeführten Monoterpenen die Abgabe von *m*-Cymen (86), *p*-Cymen (76), *cis*-Sabinenhydrat (88), *trans*-Sabinenhydrat (89) und Borneol (45).

Die verstärkte Emission der Rainfarn Sesquiterpene Germacren D (53) und Bicyclogermacren (93) ist möglicherweise auf ein polareres Oligosaccharid mit dem Molekulargewicht $M = 990 \text{ g/mol}$ aus der Fraktion F0/6 zurückzuführen, das durch HPLC/ESI-MS identifiziert wurde. Bei dieser Verbindung handelt es sich wahrscheinlich um Ajugose.

Ob die Konzentrationen der von Rainfarn nach Fraß von *Spodoptera littoralis* - Raupen emittierten Monoterpene *p*-Cymen (76), 1,8-Cineol (65), Campher (67) und Limonen (87) ausreichen, um eine toxische Wirkung gegenüber *Spodoptera littoralis*-Raupen zu entfalten, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass Oligosaccharide aus dem Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen nach Applikation an verletzte Rainfarnpflanzen die Emission von Mono- und Sesquiterpenen induzieren, die auch nach Fraß dieser Raupen an Rainfarn abgegeben werden. Das Hepta- β -D-glucosid (18) aus der Zellwand des Pilzes *Phytophthora sojae*, der bei der Sojabohnenpflanze *Glycine max* die Stamm- und Wurzelfäule auslöst, induziert in ihr die Synthese des Phytoalexins Glyceollin I (19) [21], das fungizid wirkt. In den Zellmembranen von

Glycine max Keimblättern gibt es ein Bindungs-Protein, an das das Hepta- β -D-glucosid (**18**) spezifisch mit hoher Aktivität bindet [22] und eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion einleitet. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen diesem Hepta- β -D-glucosid und den im Vorderdarmsekret von *Spodoptera littoralis* - Raupen detektierten Oligosacchariden, die die Induktion des charakteristischen Duftstoffbuketts von Rainfarnpflanzen auslösen, könnten die Oligosaccharide möglicherweise auch eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion bewirken.

4.2 Summary in English

The feeding of *Spodoptera exigua* larvae in corn plants *Zea mays* induces a characteristic emission of terpenes, which attract females of the parasitic wasp *Cotesia marginiventris*. This wasp lays eggs into larvae of *Spodoptera exigua*, which develop to larvae and use the *Spodoptera exigua* larvae as their food source. When feeding in corn plants *Spodoptera exigua* larvae introduce the elicitor volicitin (**1**) into the plant through the wound and it induces the synthesis and emission of a characteristic terpenoid odor bouquet [9].

Volicitin (**1**) has been detected in the regurgitate of *Spodoptera littoralis* larvae, but did not induce the emission of odor in cotton plants and lima bean plants [17].

The feeding of *Spodoptera littoralis* larvae in lima bean plants induces the emission of a characteristic odor bouquet. The question arose, which elicitors in the regurgitate of *Spodoptera littoralis* larvae induce the formation of odor in lima bean plants, cotton plants and many other plants that are infested by *Spodoptera littoralis* larvae.

The plant-herbivore systems tansy – *Spodoptera littoralis* larvae and tansy – *Autographa gamma* larvae were chosen by P. Gros in our workgroup to investigate this question [24, 25]. She showed that two different characteristic odor bouquets were emitted by tansy plants when *Spodoptera littoralis* larvae and *Autographa gamma* larvae were feeding.

This work addresses the search for elicitors in the regurgitate of *Spodoptera littoralis* larvae that induce the formation of volatile compounds of the odor of tansy plants.

Four HPLC-fractions F0/2, F0/4, F0/5 and F0/6, which were obtained from the aqueous SPE-extract F0 of the regurgitate, induce the emission of monoterpenes and sesquiterpenes that are also emitted upon larval feeding when they are applied to mechanically wounded tansy plants.

The extraction of an aliquot of fraction F0 with CH₃OH/H₂O 85:15 yielded 300 µg of a residue that turned out to be composed very similar to the fraction F0/6.

NMR-spectra of the fractions F0 and F0/6 were taken to gain information about the structures of the compounds in these fractions. They showed ¹H resonance signals in the area of $\delta = 3.20 - 5.40$ ppm, which indicated oligosaccharides. Processing of the 1D- and 2D-NMR data of the fraction F0/6 led to the structure of stachyose (**96**). In the ¹³C-NMR spectrum of F0/6 further signals with chemical shift values in the same area as stachyose were observed. It was suggested that these could come from homologues of stachyose (**96**) such as sucrose (**94**), raffinose (**95**) and verbascose (**96**). Therefore HPLC- and HPLC/ESI-MS measurements were performed to check this.

The oligosaccharides in fraction F0/6 were identified by comparison of their HPLC-retention times to a standard of the three commercially available saccharides sucrose (**94**), raffinose (**95**) and stachyose (**96**). Verbascope (**97**) was detected by coinjection of commercially available verbascose with the fraction F0/6. HPLC/ESI-MS of the saccharide mixture in fraction F0/6 acquired the ESI-mass spectra of the four oligosaccharides at the appropriate retention times. High resolution mass spectra of sucrose, raffinose, stachyose and verbascose were obtained from an HR-ESI-FT-ICR-mass spectrometer and are in accordance with these structures.

The commercially available oligosaccharides sucrose, raffinose, stachyose and verbascose were applied to wounded tansy plants in a similar manner as the fractions of the regurgitate. The odor of tansy was collected by CLSA and qualitatively and quantitatively analyzed by GC.

Sucrose raises the emission of *trans*-sabinol (**90**), camphor (**67**), limonene (**87**) and 1,8-cineol (**65**), as the three other oligosaccharides do. It induces the formation of *cis*- and *trans*-sabinene hydrate (**88**, **89**). Raffinose (**95**), stachyose (**96**) and verbascose (**97**) induce the emission of *m*-cymene (**86**), *p*-cymene (**76**), *cis*-sabinene hydrate (**88**), *trans*-sabinene hydrate (**89**) and borneol (**45**).

The amplified emission of the sesquiterpenes germacrene D (**53**) and bicyclgermacrene (**93**) may result from the action of a more polar oligosaccharide with a molar mass of $M = 990$ g/mol which has been detected in the fraction F0/6 by HPLC/ESI-MS. This compound is probably ajugose.

It needs further investigations to show, if the concentrations of the monoterpenes *p*-cymene (**76**), limonene (**87**), 1,8-cineol (**65**) and camphor (**67**) that are emitted after feeding of *Spodoptera littoralis* larvae, are sufficient to have a toxic effect against *Spodoptera littoralis* larvae.

In this work is shown for the first time that oligosaccharides from the regurgitate of *Spodoptera littoralis* larvae induce the emission of the same monoterpenes and sesquiterpenes that are emitted after feeding of *Spodoptera littoralis* larvae, when they are applied to mechanically wounded tansy plants. The hepta- β -D-glucoside (**18**) from the cellular wall of the fungus *Phytophthora sojae*, which is causing the rot of the stem and the roots of the soy bean plant, induces in the soy bean plant the synthesis of the phytoalexin glyceollin I (**19**) [21], which acts as a fungicide. In the cellular membranes of cotyledons of *Glycine max* is an elicitor-binding-protein to which the hepta- β -D-glucoside (**18**) specifically binds with a high affinity [22] and thus starts a receptor mediated signal transduction.

The oligosaccharides detected in the regurgitate of *Spodoptera littoralis* larvae that induce the characteristic odor bouquet of tansy plants could perhaps also start a receptor mediated signal transduction. This can be assumed, because their structure is similar to that of this hepta- β -D-glucoside.

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien

Für die HPLC und die HPLC/MS wurden Wasser, Methanol und Acetonitril in den Qualitäten „HPLC gradient grade“ und „HPLC/MS grade“ von der Firma Roth verwendet. Die n-Alkan-Standards für die GC und GC/MS wurden von der Firma Fluka bezogen. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Eurisotop erhalten. Saccharose wurde von VWR, Raffinose Pentahydrat und Stachyose Tetrahydrat von Roth und Verbascose von Sigma-Aldrich bezogen.

5.2 Pflanzen

Etwa 10 – 15 cm hohe Pflanzen von Rainfarn *Tanacetum vulgare* wurden vom Flachdach des Rechenzentrums der Universität Bayreuth (Gebäude NW II) abgeschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass die Pflanzen nicht durch Herbivore oder Pilze befallen waren, nicht blühten und keinem Hitzestress ($> 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) ausgesetzt waren. Gegebenenfalls wurde ein Teil der Fläche gemäht, um nach ca. 4 Wochen weitere geeignete Pflanzen zur Verfügung zu haben. Die Temperatur wurde an der Wetterstation des Ökologisch-Botanischen Gartens der Universität Bayreuth gemessen. Das weitere Vorgehen zur Vorbereitung und Durchführung der CLSA-Messungen ist in Abschnitt 5.4.3 beschrieben.

5.3 Herbivore

Die Aufzucht und Haltung der Herbivoren sowie die Sammlung und Aufarbeitung des Regurgitats wurden im Zeitraum von März 2002 bis Oktober 2005 von Petra Gros am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Bayreuth in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Seifert durchgeführt [24, 25].

5.3.1 Haltung der Herbivoren

Gelege von *Spodoptera littoralis* wurden von E. Marling (Lehrstuhl für Chemische Ökologie, Institut für Nutzpflanzenwissenschaft, Schwedische Universität für Agrarwissenschaften (SLU), Alnarp, Schweden) bezogen. Die geschlüpften Raupen wurden mit einer künstlichen Diät ernährt [66].

Die Raupen wurden in Plastikbehältern mit Gazedeckeln oder gelochten Plastikdeckeln bei 23 – 25 °C bei einem Tag-Nacht-Rhythmus mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit gehalten. Jeden 2. - 3. Tag wurden die Raupen in frische Dosen mit neuer Kunsnahrung gesetzt.

Zur Herstellung der Kunsnahrung wurden 500 g Weiße Bohnen über Nacht in 1200 ml Wasser eingeweicht, am nächsten Tag gemahlen und 9 g Vitamin C, 9 g Paraben und 4 ml Formalin zugegeben. 75 g Agar wurden in 1000 ml Wasser aufgekocht und das heiße Agar mit dem Bohnenbrei vermischt. Alternativ wurden Raupen auf frischen Rainfarnblättern gehalten [25].

5.3.2 Sammlung des Regurgitats

Larven von *Spodoptera littoralis* wurden mit einer Federstahlpinzette am Hinterkopf gepackt und mit sanftem Druck gereizt. Dabei sonderten sie an den Mandibeln einen Tropfen des Regurgitats ab. Dieser wurde mit einem Glaskapillarröhrchen aufgefangen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (Abbildung 79). Der Vorgang wurde mit weiteren Larven sooft wiederholt, bis eine ausreichende Menge des Regurgitats gesammelt wurde. Das Rohregurgitat wurde bis zur Aufarbeitung auf Trockeneis gelagert.



Abbildung 79: Sammlung des Regurgitats bei *Spodoptera littoralis* (Foto: P. Gros [24, 25])

5.3.3 Aufarbeitung des Regurgitats

5.3.3.1 Abtrennung von Feststoffen und Enzymen

Das Rohregurgitat wurde mit der gleichen Menge Methanol versetzt. Die ausgefällten Proteine und anderen Feststoffe wurden anschließend mit einer Zentrifuge (17000 U/min, 15 min) abgetrennt. Der Überstand wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße

überführt, in einer Vakuumzentrifuge (ALPHA RVC CMC-1, Martin Christ) zur Trockne eingengt und bei -20 °C eingefroren.

5.3.4 Festphasenextraktion

Zur Festphasenextraktion wurden Chromabond ec Polypropylensäulen mit 500 mg Festphase und 6 ml Volumen verwendet. Die Festphase wurde nacheinander mit 10 ml Acetonitril und 10 ml bidest. Wasser konditioniert.

Der Rückstand aus 1 ml frischem Regurgitat wurde in 400 µl bidest. Wasser aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde nacheinander mit 2 ml bidest. Wasser, 2 ml Wasser/Acetonitril – Gemisch 1:1 (v/v) sowie 2 ml Acetonitril eluiert und die Fraktionen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die drei Fraktionen, die nach dem Acetonitril-Anteil als F0, F50 und F100 bezeichnet wurden, wurden in einer Vakuumzentrifuge (ALPHA RVC CMC-1, Martin Christ) zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde zur weiteren Fraktionierung bzw. Analyse mittels HPLC bzw. HPLC-MS bei -20 °C eingefroren.

5.4 Closed-Loop-Stripping-Analysis

5.4.1 Aufbau der Anlage

Die Duftstoffe aus Rainfarn wurden mit der Closed-Loop-Stripping-Analysis-Methode (CLSA-Methode) gesammelt. Diese Methode wurde von Kurt Grob Anfang der siebziger Jahre zur Untersuchung von Spuren flüchtiger organischer Verunreinigungen im Trinkwasser entwickelt [67, 68]. Mit ihr lassen sich flüchtige organische Verbindungen noch in Mengen im Nanogramm-Bereich sammeln und durch anschließende GC nachweisen. Bei der CLSA-Methode wird Luft in einem geschlossenen Kreislauf durch ein gasdichtes Probengefäß über einen Aktivkohlefilter gepumpt, der minimale Mengen von im Gasraum vorhandenen Stoffen adsorbieren kann. Bevor die Luft den Aktivkohlefilter passiert, wird sie durch eine Heizung (40 °C) erwärmt, so dass bei der Entspannung der Luft im Filter keine Wasserkondensation stattfinden kann. Auf diese Weise sind Extraktionen auch bei hoher Luftfeuchtigkeit, die z.B. durch transpirierende Pflanzen verursacht wird, möglich.

In die drei baugleichen CLSA-Anlagen (Abbildung 80) wurde der Rainfarn in einem Exsikkator in den Kreislauf integriert. Die Miniaturdrehschieberpumpen (DC12/16NK,

Fürgut) arbeiteten mit einem Fluss von 2 l/min. Die Duftstoffe wurden an Aktivkohlefiltern (1,5 mg Aktivkohle, Länge des Glasrohres 60 mm, Durchmesser 5 mm) der Firma Gränicher & Quartero adsorbiert. Mit Ausnahme der Exsikkatoren wurde die restliche Anlage an der Universität Bayreuth von der Mechanik- und Elektronikwerkstatt hergestellt [69].



Abbildung 80: Aufbau einer CLSA-Anlage - 1 Exsikkator mit Rainfarn, 2 Heizblock, 3 Filterhalter, 4 Miniaturpumpe, 5 Übergangsstück mit Teflonstopfen, Luftansaugrohr und Lufteinlassrohr, 6 Steuergerät. Die Flussrichtung des Luftstroms ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

5.4.2 Reinigung der CLSA-Anlage

Zu Beginn jedes Messjahres und bei Bedarf wurde die CLSA-Anlage auseinander gebaut und das Rohrleitungssystem, der Exsikkator, der Filterhalter und die Teflonverbindung wurden nacheinander je einmal mit Dichlormethan und mit bidest. Wasser gespült und jeweils für 4 h bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet.

Vor jeder Messung mussten etwaige Kontaminationen aus der Umgebungsluft aus dem CLSA-System entfernt werden. Dazu diente ein HC-Aktivkohlefilter (Fa. Roth), der auf das Ansaugrohr der CLSA-Anlage aufgesteckt wurde. Anschließend wurde über Nacht gereinigte Luft durch die Anlage gespült.

5.4.3 Durchführung der CLSA-Messung

Zum Zeitpunkt $t = 0$ h, jeweils zwischen 7:30 Uhr und 8:00 Uhr des Messtages wurden für jede Messung und CLSA-Anlage vier ca. 10 – 15 cm hohe unbefallene Blätter der Rainfarnpflanzen vom Flachdach des Rechenzentrums der Universität Bayreuth (Gebäude NW II) abgeschnitten. Diese wurden mit einer Schere im Umfang des maximalen Fraßschadens, der durch 4 Raupen in 2 Stunden entsteht [24, 25], mechanisch verletzt (Abbildung 81).



Abbildung 81: Rainfarnblatt, mechanisch verletzt

- a) Die lediglich mechanisch verletzten Kontrollpflanzen wurden anschließend für 3 h bei Raumtemperatur unter Leuchtstoffröhrenlicht in Leitungswasser gestellt. Anschließend wurden die Stiele ca. 1 cm gekürzt und die Pflanzen gewogen.

- b) Für die Elicitierungen mit HPLC-Fractionen des Regurgitats wurden die Versuchspflanzen für 3 h bei Raumtemperatur unter Leuchtstoffröhrenlicht in 1,00 ml Lösung der zu testenden HPLC-Fraktion in Leitungswasser gestellt. Anschließend wurden die Stiele, die mit der Lösung in Kontakt kamen, abgeschnitten und die Pflanzen gewogen.
- c) Für die Elicitierungen mit Oligosaccharid-Lösungen wurden die Versuchspflanzen für 3 h bei Raumtemperatur unter Leuchtstoffröhrenlicht in 1,00 ml Lösung von 1,5 mg des jeweiligen Oligosaccharids (Saccharose, Raffinose, Stachyose oder Verbascose) in Leitungswasser gestellt. Anschließend wurden die Stiele, die mit der Lösung in Kontakt kamen, abgeschnitten und die Pflanzen gewogen.

Mit jeder zu testenden HPLC-Fraktion und Oligosaccharidlösung sowie mit Wasser (Kontrollen) wurden jeweils drei CLSA-Messungen mit Rainfarnpflanzen durchgeführt, um die statistische Abweichung bestimmen zu können.

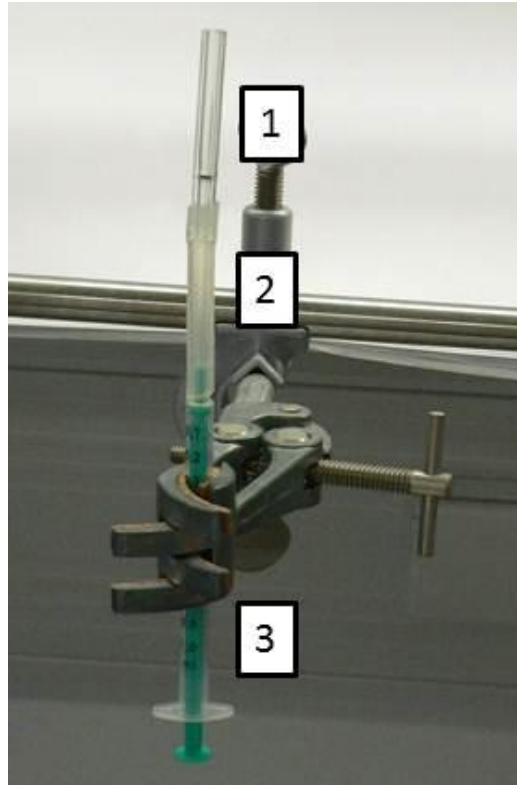
Außerdem wurde zum Zeitpunkt $t = 2$ h die CLSA-Anlage eingeschaltet und der Heizblock auf 40 °C temperiert, um das Stahlrohr vor dem Aktivkohlefilter zu erwärmen. Ferner wurde ein HC-Aktivkohlefilter an das Ansaugrohr angebracht um eventuelle Kontaminationen im System zu entfernen.

Zum Zeitpunkt $t = 3$ h wurden die Versuchspflanzen bzw. Kontrollpflanzen in Leitungswasser eingestellt und in den Exsikkator der CLSA-Anlage eingebracht. Es wurde in jede Anlage ein 1,5 mg Aktivkohlefilter eingebaut und eine vierstündige CLSA-Messung durchgeführt.

5.4.4 Extraktion des Aktivkohlefilters

Die Extraktion der Aktivkohlefilter muss quantitativ und in einem möglichst kleinen Lösemittelvolumen erfolgen, so dass die adsorbierten Duftstoffe in einer möglichst hohen Konzentration in der resultierenden GC-Probe vorliegen.

Dazu wurde eine 1 ml Einwegspritze mit 0,01 ml Feineinteilung (Injekt F, Fa. Roth) in eine Stativklemme eingespannt und über einen Silikonschlauch an den Aktivkohlefilter gekoppelt (Abbildung 82).



**Abbildung 82: Aufbau der Spritzen-Aktivkohlefilter-Kopplung zur Extraktion des Filters -
1 CLSA-Aktivkohlefilter, 2 Silikonschlauch, 3 1 ml Einwegspritze**

Mit einer Mikroliterspritze (Fa. Hamilton) wurden 10 μl einer Lösung von 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$ *n*-Bromundecan als internem Standard in Dichlormethan auf den Filter gegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abbewegen des Stempels der 1 ml Spritze wurde das Dichlormethan 20-mal durch den Aktivkohlefilter gezogen. Dabei musste das Dichlormethan immer in Kontakt mit dem Filterkissen bleiben, da ansonsten der Verlust der Probe erfolgte. Das Lösungsmittel wurde sodann vorsichtig über das Filterkissen geschoben und in eine 10 μl GC-Spritze aufgenommen und in ein GC-Probengläschen mit Spitzbodenglaseinsatz überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Stahlmembran des Aktivkohlefilters nicht durch Berührung mit der Spritze beschädigt wurde. Diese Extraktion wurde wiederholt. Dadurch wurden nach Vereinigung der Extrakte ca. 95 % der adsorbierten Duftstoffe in 16 μl Lösung erhalten [70]. Die Extrakte wurden bis zur GC-Messung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um eine Verflüchtigung der Duftstoffe zu unterbinden. Die Proben wurden anschließend baldmöglichst durch GC vermessen.

5.4.5 Reinigung und Aktivierung des Aktivkohlefilters

Der Filter musste nach jedem Gebrauch gereinigt werden. Dazu wurde er an eine 10 ml Glasspritze gekoppelt. Es wurden neunmal jeweils 10 ml Dichlormethan mehrmals durch den Filter hin- und hergezogen. Anschließend wurde der Filter für 10 min im Hochvakuum getrocknet und für mindestens 8 h bei 80 °C im Trockenschrank aktiviert.

Nach mehrmaligem Gebrauch musste der Filter regeneriert werden, da sich Oxidationsprodukte und Salze auf der Stahlmembran des Filters ansammelten, die die Kapazität des Filters verringerten. Dazu wurde der Filter dreimal mit 5 ml 1M Salpetersäure gespült und für 5 min ins Hochvakuum eingebracht, damit er vollständig mit Salpetersäure durchdrungen war. Anschließend wurde der Filter für 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen, mit 5 ml Aceton gespült und für 10 min im Hochvakuum getrocknet. Nach der Aktivierung im Trockenschrank war der Filter wieder einsatzbereit.

5.5 Gaschromatographie

Für die Duftstoffanalyse des Rainfarns wurde folgender Gaschromatograph verwendet:

Typ/Hersteller:	Trace GC (CE Instruments/Thermo Quest)
Säulentyp:	DB-5 (J&W Scientific)
Säulenlänge:	30 m
Innendurchmesser:	0,32 mm
Filmdicke:	0,1 µm
Injektor, Split:	1:5 oder 1:10
Injektortemperatur:	270 °C
Injektionsvolumen:	3 µl
Trärgas:	H ₂ (Fluss: 2 ml/min)
Detektor:	FID
Detektortemperatur:	290 °C
Software:	Chrom-Card 32-bit Version 1.07 (Thermo Quest)
Temperaturprogramm:	42 °C 5 min isotherm Heizrate: 4 °C/min

170 °C 1 min isotherm

Heizrate: 20 °C/min

280 °C 10 min isotherm

Zur qualitativen Bestimmung der Duftstoffe in den Extrakten wurden aus ihren Retentionszeiten durch Vergleich mit den Retentionszeiten von zusätzlich zugefügten n-Alkan-Standards (C₉-C₂₀) [71] ihre Kovats-Indices berechnet. Die Zuordnung und Strukturbestimmung der Duftstoffe erfolgte dann durch Vergleich der Kovats-Indices mit den Literaturwerten [25]. In der Arbeit [25] sind durch GC/MS-Messungen von Referenzsubstanzen die Strukturen einiger Duftstoffe validiert worden. Diese Kovats-Indices und MS der Duftstoffe sind in Abschnitt 7 wiedergegeben.

Die quantitative Bestimmung der Duftstoffe erfolgte durch Vergleich der jeweiligen Peakflächen mit der Peakfläche des internen Standards n-Bromundecan. Die Duftstoffkonzentrationen wurden als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen in den Abbildungen 35-38, 54-71 und 73-78 angegeben.

5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

5.6.1 Analytische HPLC

Für die analytische HPLC wurden folgende Geräte verwendet:

Injektion:	manuell
Entgaser:	keiner
Pumpen:	2x Knauer HPLC-Pumpe Typ 64.00
Trennsäule:	wie bei den einzelnen Chromatogrammen angegeben
Laufmittel:	wie bei den einzelnen Chromatogrammen angegeben
Detektor:	Knauer Spektralphotometer A0293
Wellenlängen:	200 nm, 210 nm, 254 nm, wie jeweils angegeben
Injektionsvolumen:	20 µl

5.6.2 HPLC-MS

Bei der HPLC-MS-Messung wurden folgende Geräte verwendet:

HPLC:

Injektion: Autosampler SIL-10AD_{VP} (Shimadzu)
Entgaser: Degasser 234 (SunChrom)
Pumpen: 2x MicroPro (Eldex)
Säulenthmostat: Mistral mit integriertem manuellem Injektionsventil
(Spark Holland)
Temperatur: 37 °C
Trennsäule: wie bei den einzelnen Chromatogrammen angegeben
Laufmittel: wie bei den einzelnen Chromatogrammen angegeben
Detektor: kein UV-Detektor, ausschließlich Messung des TIC im MS
Interface-Box: SCL-10A_{VP} (Shimadzu)
Injektionsvolumen: 20 µl

Massenspektrometer:

Typ/Hersteller: LCMS-2010 (Shimadzu)
Ionisierung: ESI (1,5 kV)
Software: LCMSsolution 2.05 (Shimadzu)

5.6.3 Herstellung eines Oligosaccharid-Standards für die HPLC

In 400 µl CH₃CN/H₂O 1:1 (v/v) wurden 3,42 mg (10,0 µmol) D-(+)-Saccharose, 5,94 mg (10,0 µmol) D-(+)-Raffinose Pentahydrat und 7,38 mg (10,0 µmol) D-(+)-Stachyose Tetrahydrat gelöst. Es wurden 20 µl dieses Standards für die HPLC-Messung eingesetzt.

5.6.4 HPLC-Messung der präparativ gewonnenen Fraktion F0/6

40 µg der nach dem Protokoll in Abschnitt 5.8.2 gewonnen Trockensubstanz von Fraktion F0/6 wurden in 100 µl CH₃CN/H₂O 1:1 (v/v) gelöst. Es wurden 20 µl dieser Lösung für die HPLC-Messung eingesetzt.

5.6.5 HPLC-Messung einer Coinjektion von Fraktion F0/6 und Verbascode

In 40 µl der Probenlösung von Fraktion F0/6 aus 5.6.4 wurde 0,205 mg (0,25 µmol) wasserfreie D-(+)-Verbascode gelöst. Es wurden 20 µl dieser Lösung für die HPLC-Messung eingesetzt.

5.7 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS-ESI-FT-ICR)

Die hochauflösende Massenspektrometrie wurde von Herrn Dr. Jürgen Schmidt am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle durchgeführt. Die positiven und negativen ESI-Massenspektren wurden mit einem „*Bruker apex III* Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance“ (FT-ICR) Massenspektrometer (*Bruker Daltonics*, Billerica, USA) aufgenommen, das mit einer „*Infinity*®“ Zelle, einem supraleitenden Magneten mit einer Feldstärke von 7,0 Tesla (*Bruker*, Karlsruhe), einem Radiofrequenz-Hexapol-Ionenführungssystem (im „RF-only“ Betrieb) und einer externen Elektrosprayionenquelle (*Agilent*, off axis spray) ausgerüstet war. Zur Trocknung wurde Stickstoff bei einer Temperatur von 150 °C eingesetzt. Die Probenlösung wurde über eine Pumpe mit einem stetigen Fluss von 120 µl/h zugefügt. Die Daten wurden mit einer Auflösung von 512k Datenpunkten aufgezeichnet durch Zero-Filling auf 2048k ergänzt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit der XMASS 7.0.8 software (*Bruker Daltonik*, Bremen).

5.8 NMR-Spektroskopie

5.8.1 Herstellung einer NMR-Probe von Fraktion F0 (gesamt)

Es wurden 300 µg des gefriergetrockneten Rückstands der Fraktion F0 der Festphasenextraktion (siehe Abschnitt 5.3.3.2) in 0,4 ml D₂O gelöst und NMR-spektroskopisch vermessen.

5.8.2 Herstellung einer NMR-Probe von Fraktion F0/6

Es wurden 800 µg des gefriergetrockneten Rückstands der Fraktion F0 der Festphasenextraktion (siehe Abschnitt 5.3.3.2) in ein GC-Probenfläschchen mit Schraubdeckel vorgelegt und für 20 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad in 1,5 ml einer Mischung von Methanol und Wasser 85:15 (v/v) suspendiert. Anschließend

wurde die Probe bei 17000 U/min für 15 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Der Rückstand wurde für 2 h bei Raumtemperatur im Hochvakuum getrocknet. Man erhält als Gesamtausbeute 300 µg eines braunen Feststoffs, der sich als angereicherte Fraktion F0/6 im Gemisch mit der weiteren Fraktion F0/5 herausstellte. Dieses Produkt wurde in 0,4 ml D₂O gelöst und NMR-spektroskopisch vermessen.

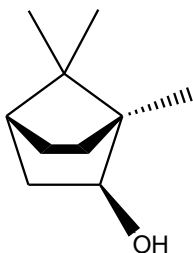
5.8.3 Gerätedaten

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 300 Spektrometer bei 298 K erstellt. Die Resonanzfrequenzen betrugen 300 MHz für ¹H- und 75,435 MHz für ¹³C-Messungen. Die Werte für die chemischen Verschiebungen wurden auf das Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels abgeglichen.

6. Duftstoffe des Rainfarns

6.1 Monoterpene

Borneol (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 45)



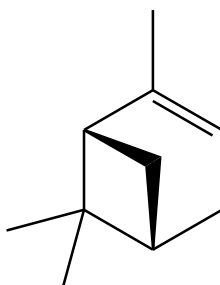
Summenformel: $C_{10}H_{18}O$

M = 154,25 g/mol

Kovats-Index: 1159,0 ([72]: 1155,5)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 136 (7), 121 (21), 110 (16), 95 (100), 79 (12), 67 (8), 55 (11), 41 (20).

α -Pinen (2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en, 49)



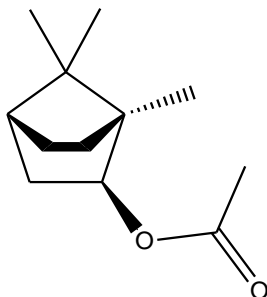
Summenformel: $C_{10}H_{16}$

M = 136,23 g/mol

Kovats-Index: 925,0 ([72]: 923,5)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 136 (10) [M]⁺, 121 (9), 105 (12), 93 (100), 79 (26), 67 (9), 53 (7), 41 (14).

Bornylacetat (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ylacetat , 51)



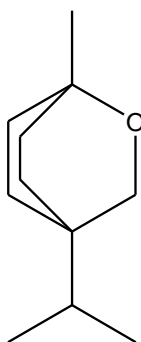
Summenformel: C₁₂H₂₀O₂

M = 196,29 g/mol

Kovats-Index: 1279,0 ([72]: 1276,0)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 154 (4), 136 (21), 121 (26), 108 (11), 95 (73), 80 (13), 67 (21), 55 (12), 43 (100).

1,8-Cineol (1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan, 65)

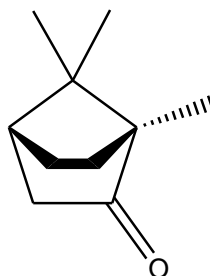
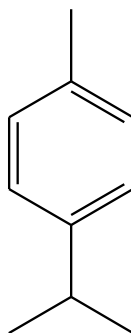


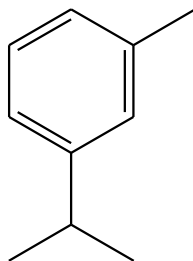
Summenformel: C₁₀H₁₈O

M = 154,25 g/mol

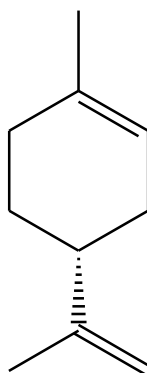
Kovats-Index: 1024,0 ([72]: 1022,0)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 154 (3) [M]⁺, 139 (12), 125 (4), 108 (17), 93 (22), 81 (30), 67 (21), 55 (23), 43 (100).

Campher (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-on, 67)Summenformel: $C_{10}H_{16}O$ $M = 152,23 \text{ g/mol}$ **Kovats-Index:** 1134,0 ([72]: 1132,0)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 152 (3) $[M^+]$, 137 (3), 108 (36), 95 (100), 81 (67), 76 (54), 55 (51), 41 (97).***p*-Cymen (76)**Summenformel: $C_{10}H_{14}$ $M = 134,22 \text{ g/mol}$ **Kovats-Index:** 1019,6 ([72]: 1015,6)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 134 (31) $[M]^+$, 119 (100), 105 (3), 91 (19), 77 (4), 65 (4), 53 (2), 41 (10).

***m*-Cymen (86)**Summenformel: C₁₀H₁₄

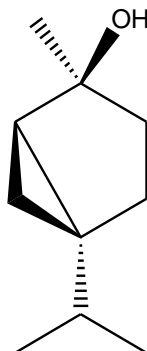
M = 134,22 g/mol

Kovats-Index: 1017,3 ([72]: 1015,6)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 134 (37) [M]⁺, 119 (100), 105 (7), 91 (14), 77 (6), 65 (8), 51 (4), 41 (8).**Limonen (1-Methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-cyclohex-1-en, 87)**Summenformel: C₁₀H₁₆

M = 136,23 g/mol

Kovats-Index: 1021,5 ([72]: 1019,5)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 136 (9) [M]⁺, 121 (11), 107 (12), 93 (89), 79 (46), 67 (100), 53 (28), 41 (32).

***cis*-Sabinenhydrat (5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 88)**



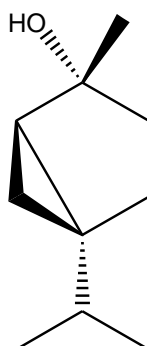
Summenformel: C₁₀H₁₈O

M = 154,25 g/mol

Kovats-Index: 1066,0 ([72]: 1059,6)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 154 (2) [M]⁺, 139 (8), 121 (18), 111 (19), 93 (31), 81 (25), 71 (27), 55 (22), 43 (100).

***trans*-Sabinenhydrat (5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 89)**

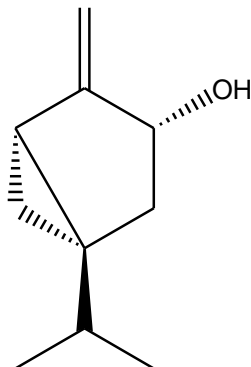


Summenformel: C₁₀H₁₈O

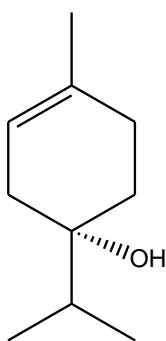
M = 154,25 g/mol

Kovats-Index: 1092,0 ([72]: 1090,8)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 154 (3) [M]⁺, 139 (9), 121 (15), 111 (17), 93 (41), 81 (26), 71 (31), 55 (22), 43 (100).

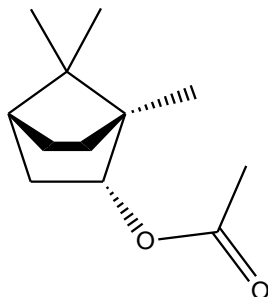
***trans*-Sabinol (1-Isopropyl-4-methylenbicyclo[3.1.0]hexan-3-ol , 90)**Summenformel: C₁₀H₁₆O

M = 152,23 g/mol

Kovats-Index: 1130,0 ([72]: 1127,6)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 152 (1) [M]⁺, 134 (22), 119 (58), 105 (26), 91 (100), 79 (48), 65 (15), 55 (28), 43 (19).**Terpinen-4-ol (1-Isopropyl-4-methylcyclohex-3-enol, 91)**Summenformel: C₁₀H₁₈O

M = 154,23 g/mol

Kovats-Index: 1169,0 ([72]: 1168,5)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 154 (6) [M]⁺, 136 (8), 125 (2), 111 (38), 93 (62), 81 (30), 71 (99), 67 (32), 55 (37), 43 (100).

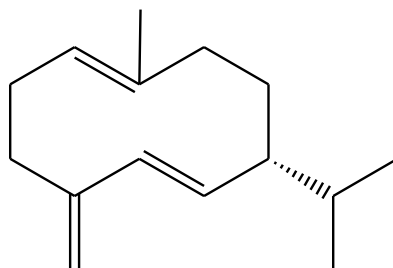
Isobornylacetat (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ylacetat, 92)Summenformel: C₁₂H₂₀O₂

M = 196,29 g/mol

Kovats-Index: 1279,0 ([72]: 1276,0)**MS (EI, 70 eV), m/z (%):** 154 (3), 136 (29), 121 (33), 108 (17), 95 (70), 81 (21), 67 (20), 55 (14), 43 (100).

6.2 Sesquiterpene

Germacren D ((1*E*,6*E*)-8-Isopropyl-1-methyl-5-methylcyclodeca-1,6-dien, 53)



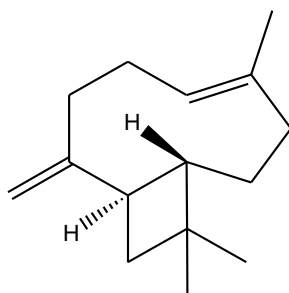
Summenformel: C₁₅H₂₄

M = 204,35 g/mol

Kovats-Index: 1470,0 ([72]: 1466,7)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 204 (21) [M]⁺, 161 (100), 147 (10), 133 (22), 119 (47), 105 (85), 91 (70), 81 (44), 67 (24), 53 (18), 41 (79).

***trans*-β-Caryophyllen** (4,11,11-Trimethyl-8-methylenbicyclo-[7.2.0]-undec-4-en, 62)



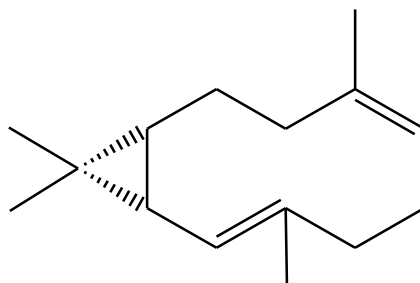
Summenformel: C₁₅H₂₄

M = 204,35 g/mol

Kovats-Index: 1403,6 ([72]: 1403,4)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 204 (2) [M]⁺, 189 (9), 175 (5), 161 (11), 147 (14), 133 (35), 119 (16), 105 (41), 91 (64), 79 (49), 69 (32), 55 (21), 41 (100).

Bicyclogermacren ((2Z,6Z)-3,7,11,11-Tetramethylbicyclo-[8.1.0]-undeca-2,6-dien, 93)



Summenformel: $C_{15}H_{24}$

M = 204,35 g/mol

Kovats-Index: 1482,0 ([72]: 1481,0)

MS (EI, 70 eV), m/z (%): 204 (9) $[M]^+$, 189 (7), 175 (2), 161 (38), 147 (9), 133 (14), 121 (100), 107 (51), 93 (87), 79 (57), 67 (52), 53 (40), 41 (92).

7. Literaturverzeichnis

- [1] C. L. Murray, M. Quaglia, J. T. Arnason, C. E. Morris, *J. Neurobiol.*, **1994**, 25, 23-34.
- [2] S. P. Maddrell, B. O. C. Gardiner, *J. Exp. Biol.*, **1976**, 64, 267-281.
- [3] S. A. M. Abdelgaleil, *Appl. Entomol. Zool.*, **2010**, 45, 425-433.
- [4] R. Pavela, *J. Biopestic.*, **2010**, 3, 573-578.
- [5] G. W. Felton, J. H. Tumlinson, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2008**, 11, 457-463.
- [6] L. Mattiacci, M. Dicke, M. A. Posthumus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 96, 2036-2040.
- [7] J. Wu, E. T. Baldwin, *Plant Cell Environ.*, **2009**, 32, 1161-1174.
- [8] N. E. Fatouros, G. B. Kiss, L. A. Kalkers, R. S. Gamboreno *et al.*, *Entomol. Exp. Appl.*, **2005**, 207-215.
- [9] H. T. Alborn, T. C. S. Turlings, T. H. Jones, G. Stenhagen *et al.*, *Science*, **1997**, 276, 945-949.
- [10] S. D. Lawreace, N. G. Novak, *J. Chem. Ecol.*, **2004**, 30, 2543-2557.
- [11] R. Halitschke, U. Schittko, G. Pohnert, W. Boland, I. T. Baldwin, *Plant Physiol.*, **2001**, 125, 711-717.
- [12] G. Pohnert, V. Jung, E. Houkioja, K. Lempa, W. Boland, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 11275-11280.
- [13] J. H. Tumlinson, C. G. Lait, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **2005**, 58, 54-68.
- [14] P. W. Paré, H. T. Alborn, J. H. Tumlinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, 95, 13971-13975.
- [15] C. L. Truitt, H. X. Wei, P. W. Paré, *The Plant Cell*, **2004**, 16, 523-532.
- [16] D. Spiteller, G. Pohnert, W. Boland, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1483-1485.
- [17] M. Maffei, S. Bossi, D. Spiteller, A. Mithöfer, W. Boland, *Plant Physiol.*, **2004**, 134, 1752-1762.
- [18] H. T. Alborn, T. V. Hansen, T. H. Jones, D. C. Bennett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 12976-12981.
- [19] E. A. Schmelz, M. J. Carroll, S. Leclere, S. M. Phipps *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 8894-8899.
- [20] R. P. Doss, J. E. Oliver, W. M. Proebsting, S. W. Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97, 6218-6223.
- [21] J. K. Sharp, B. Valent, P. Albersheim, *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 11312-11320.

- [22] M.G. Hahn *et al.*, *Dev. Plant Pathol.*, **1993**, 2, 99-116.
- [23] M. Leitner, R. Kaiser, M. O. Rasmussen, H. Driguez *et al.*, *Phytochemistry*, **2008**, 69, 2029-2040.
- [24] P. Gros, Laborprotokolle, **2002 – 2005**.
- [25] J. Burkhardt, Diplomarbeit „Duftstoffe aus Rainfarn nach Herbivorbefall und Untersuchungen zum Metabolismus von Gentisinsäure im Hühnerembryo“, Universität Bayreuth, **2008**.
- [26] <http://www.defra.gov.uk/planth/pestnote/2006/spodoptera.pdf>
- [27] http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-8923.html
- [28] V. H. Heywood, „*Tanacetum* L.“ in: Plantaginaceae to Composite (and Rubiaceae), Ed.: T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, *Flora Europaea (Vol. 4)*, Cambridge University Press, Cambridge, **1976**.
- [29] A. Kekulé, „Lehrbuch der organischen Chemie“, Verlag von Ferdinand Enke, Erlangen, **1863**
- [30] E. Breitmaier, „Terpene“, Teubner Verlag, Wiesbaden, **1999**.
- [31] H. K. Lichtenthaler, M. Rohmer, J. Schwender, *Physiol. Plant.*, **1997**, 101, 643-652.
- [32] D. Umlauf, J. Zapp, H. Becker, K. P. Adam, *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2463-2470.
- [33] <http://de.wikipedia.org/wiki/Mevalonatweg>
- [34] S. L. Spurgeon, J. W. Porter, „Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl-pyrophosphate: biosynthesis of isoprenoid compounds“, Ed.: S. L. Spurgeon, J. W. Porter, Wiley, New York, **1981**, 1.
- [35] Alle EC-Nummern aus: ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics, <http://www.expasy.org>
- [36] D. H. Shah, W. W. Cleland, J. W. Porter, *J. Biol. Chem.*, **1965**, 240, 1946-1956.
- [37] <http://de.wikipedia.org/wiki/Methylethylerythritolphosphatweg>
- [38] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.*, **1993**, 295, 517-524.
- [39] S. T. J. Broers, Dissertation „Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*“, ETH Zürich, **1994**.
- [40] M. K. Schwarz, Dissertation „Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte“, ETH Zürich, **1994**.

- [41] G. Popják, J. W. Cornforth, *Biochem. J.*, **1966**, *101*, 553-568.
- [42] J. D. Conolly, R. A. Hill, „Dictionary of Terpenoids“, *Chapman & Hall Verlag*, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, **1991**.
- [43] R. Croteau, M. L. Wise, „Monoterpene biosynthesis“ in: “Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids”, Ed.: D. E. Cane, *Comprehensive Natural Products Chemistry (Vol. 2)*, *Elsevier Verlag*, London, **1998**.
- [44] D. C. Hyatt, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2005**, *439*, 222–233.
- [45] J. Bohlmann, C. L. Steele, R. Croteau, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *273* (35), 21784-217892.
- [46] N. Bülow, W. A. König, *Phytochemistry*, **2000**, *55*, 141-168.
- [47] C. O. Schmidt et al., *Chirality*, **1999**, *11*, 353-362.
- [48] D. Grosjean, E. L. Williams, II, J. H. Seinfeld, *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, *26*, 1526-1533.
- [49] C. S. White, *J. Chem. Ecol.*, **1994**, *20*, 1381-1406.
- [50] J. T. Knudson, L. Tollsten, G. Bergström, *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 253-280.
- [51] G. Birgersson, G. Bergström, *J. Chem. Ecol.*, **1989**, *15*, 2465-2483.
- [52] J. A. Byers, F. Schlyter, G. Birgersson, W. Francke, *Experientia*, **1990**, *46*, 1209-1211.
- [53] P. Ivarsson, F. Schlyter, G. Birgersson, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **1999**, *23*, 655-662.
- [54] F. Schlyter, G. Birgersson, A. Leufven, *J. Chem. Ecol.*, **1989**, *15*, 2263-2277.
- [55] N. Gören, E. Tahtasakal, J. M. Pezzuto, G. A. Cordell et al., *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 389-392.
- [56] H. Susurluk, Z. Caliskan, O. Guerkan, S. Kirmiziguel et al., *Ind. Crops Prod.*, **2007**, *26*, 220-228.
- [57] R. P. Srivastava, P. Proksch, V. Wray, *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 3445.
- [58] I. Hiltbold, T. C. J. Turlings, *J. Chem. Ecol.*, **2008**, *34*, 628-635.
- [59] J. Degenhardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2009**, *106*, 13213-13218.
- [60] Z. L. Nikolov, J. B. Jakovljevic, Z. M. Boskov, *Starch / Stärke*, **1985**, *36*, 97-100.
- [61] G. A. Morris, L. D. Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 4703-4711.
- [62] D. D. McIntyre, H. J. Vogel, *J. Nat. Prod.*, **1989**, *52*, 1008-1014.
- [63] L. S. Fialho, V. M. Guimaraes, E. G. de Barros, M. A. Moreira et al., *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2006**, *61*, 87-89.
- [64] S. Kawamura, K. D. Nogokubu, *Gokujutsu Hokoku*, **1963**, *15*, 29-33.

- [65] A. S. Abdel-Gawad, *Food Chem.*, **1993**, 46, 25-31.
- [66] D. Spiteller, Dissertation „Charakterisierung von N-Acyl-glutaminkonjugaten aus dem Regurgitat von *Lepidoptera* Larven“, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2002**.
- [67] K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr.*, **1973**, 84, 255-273.
- [68] K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr.*, **1976**, 117, 285-294.
- [69] O. Terhorst, Diplomarbeit „Duftstoffe von *Hordeum vulgare* L., var. Mammut nach Elicitierung“, Universität Bayreuth, **1997**.
- [70] A. Habich, K. Grob, *J. High Res. Chrom. & Chrom. Commun.*, **1984**, 7, 492-494.
- [71] T. Koch, T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth, W. Boland, *Plant Physiol.*, **1999**, 121, 153-162.
- [72] R. P. Adams, „Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry“, *Allured Books*, Carol Stream, **2004**

8. Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karlheinz Seifert für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung dieses Themas zur Promotion, die stete intensive Betreuung, viele wertvolle wissenschaftliche Diskussionen und die notwendigen Freiheiten bei der Bearbeitung.

Besonders danken möchte ich auch meinem Vater, Herrn Prof. Dr. Gerhard Mack, für die stete persönliche Unterstützung meines Promotionsvorhabens und für wertvolle wissenschaftliche Diskussionen.

Ich danke Frau Petra Gros für umfangreiche Arbeiten zur Duftstoffemission von Rainfarn bei Fraß von *Spodoptera littoralis* - Raupen, für die Aufzucht und Haltung der Herbivoren sowie die Sammlung und Überlassung des Regurgitats. Ich danke Herrn Jens Burkhardt für die umfassende Dokumentation dieser Studien.

Ich danke Herrn Tobias Müller für die Aufnahme von NMR-Spektren und Herrn Dr. Jürgen Schmidt vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle für die Aufnahme von HR-ESI-FT-ICR-Massenspektren.

Mein Dank gilt auch Frau Nadja Nagel, Herrn Marc-André Schneider, Herrn Matthias Göhl und der gesamten Arbeitsgruppe am Lehrstuhl Organische Chemie NW II für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit in unserem Labor.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann und Frau Franziska Wende am Lehrstuhl Tierökologie I für die Möglichkeit, die HPLC/MS-Anlage zu benutzen.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 678 "Ökologische Bedeutung von Wirk- und Signalstoffen bei Insekten- von der Struktur zur Funktion" für die finanzielle Unterstützung.

Weiterhin danke ich dem Ökologisch-Botanischem Garten der Universität Bayreuth für Klimadaten.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbst verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 11. 1. 2012

(Dipl.-Biochem. Lienhard Mack)